



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Στόχευση του mTOR σηματοδοτικού μονοπατιού με σκοπό την
ανάπτυξη αντικαρκινικών θεραπειών για τον καρκίνο του
θυρεοειδούς

Παπαποστόλου Ίριδα

Επιβλέπων Καθηγητής: Κωνσταντίνος Δήμας, Αναπληρωτής Καθηγητής
Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα
Συνεπιβλέποντες Καθηγητές:

- Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα
- Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

ΛΑΡΙΣΑ 2019





UNIVERSITY OF THESSALY
FACULTY OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY
HEALTH SCIENCES DEPARTMENT

BACHELOR THESIS

*Targeting the mTOR signaling pathway for the development of
anticancer therapies in thyroid cancer*

Papapostolou Irida

Supervisor: Konstantinos Dimas, Associate Professor of Pharmacology in the Faculty of Medicine, University of Thessaly, Larissa.

Co-Supervisors:

- Anna Maria Psarra, Assistant Professor in the Faculty of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, Larissa.
- Nikolaos Balatsos, Assistant Professor in the Faculty of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, Larissa.

Larissa 2019



Ευχαριστίες

Θέλω να ευχαριστήσω τον Κο. Κωνσταντίνο Δήμα, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Φαρμακολογίας, στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα, που μου επέτρεψε να επιτελέσω την πτυχιακή μου άσκηση στο εργαστήριο του.

Την Κα. Ευαγγελία Σερέτη, διδάκτορα του τμήματος Φαρμακολογίας, στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα, για την καθοδήγηση και την στήριξή της καθόλη την διάρκεια της πτυχιακής μου άσκησης.

Την Κα. Άννα-Μαρία Ψαρρά, επίκουρο καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα, και τον Κο. Νικόλαο Μπαλατσό, επίκουρο καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα, που αποτέλεσαν μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της πτυχιακής μου άσκησης.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου για την στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια και που μου προσέφεραν την δυνατότητα να σπουδάσω μια υπέροχη επιστήμη.

Περίληψη

Ο καρκίνος αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας παγκοσμίως. Μία σοβαρή αλλά και σπάνια μορφή καρκίνου αποτελεί και ο καρκίνος του θυρεοειδούς, αν και οι περισσότεροι ασθενείς με καρκίνο αυτού του τύπου επιτυγχάνουν πλήρη ίαση. Μέχρι πρότινος η αντιμετώπιση αυτής της μορφής καρκίνου, που προσβάλλει συνήθως άτομα μεγαλύτερα των 40 ετών, ιδίως γυναίκες, γινόταν με χημειοθεραπείες ή χρήση αντικαρκινικών φαρμάκων. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί κάποιοι αναστολείς που στοχεύουν το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-Akt-mTOR, και πιο συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα mTORC1 και mTORC2 και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην αντιμετώπιση του καρκίνου του θυρεοειδούς πιο εντατικά. Αυτοί οι αναστολείς αποτέλεσαν και το πεδίο έρευνας στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία. Πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα προκειμένου να διαπιστωθεί η ικανότητα των mTOR αναστολέων Everolimus, Deforolimus, XL388, AZD2014 και AZD8055 να αναστέλλουν την ανάπτυξη κύτταρων δύο σοβαρών μορφών καρκίνου του θυρεοειδούς, της αναπλαστικής μορφής καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος και της θηλώδους μορφής. Πράγματι, οι περισσότεροι αναστολείς κατάφεραν να αναστείλουν την ανάπτυξη αυτών των κυττάρων *in vitro*, και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις να οδηγήσουν και σε κυτταρικό θάνατο. Με τη μέθοδο SRB μελετήθηκε η αντιπολλαπλασιαστική δράση των αναστολέων σε καρκινικά κύτταρα του θυρεοειδούς, PTC και 8505C. Επιπλέον, μέσω των μεθόδων SDS PAGE ηλεκτροφόρηση και Western Blot μελετήθηκαν διαφορές στην πρωτεϊνική σύσταση μεταξύ των κυττάρων PTC και 8505C. Πράγματι, μεταξύ αυτών των κυτταρικών σειρών, υπήρχαν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης κάποιων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι PI3K-Akt-mTOR, αποτέλεσμα που εξηγεί και την διαφορετική δράση των υπό μελέτη αναστολέων ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας θα μπορούσαν να αποτελέσουν βάση για περαιτέρω μελέτη της δράσης των συγκεκριμένων αναστολέων που μελετήθηκαν στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος.

ABSTRACT

Cancer has always been a serious health problem worldwide. There are many different types of cancer and a rare but sometimes serious type is the cancer of the Thyroid gland, although most patients can fully recover from it. The cancer of thyroid gland is most frequent amongst people above the age of 40, particularly women. The main treatment for this type of cancer is chemotherapy. Lately though, a new type of inhibitors, that target the PI3K-Akt-mTOR pathway, and to be more precise, the mTORC1 and the mTORC2 complexes, have been developed. The study of these inhibitors and the way they disrupt the proliferation of cells was the main purpose of this thesis. *In vitro* experiments were conducted for the inhibitors known as Everolimus, Deforolimus, XI388, AZD2014 and AZD8055 and the results showed that they can stop the proliferation and even cause cell apoptosis in two cell lines of Thyroid Cancer. The cell lines used were the 8505C cell line, of the Anaplastic thyroid carcinoma and the PTC cell line, of the Papillary carcinoma of Thyroid. The SRB assay was used to determine the effect of these inhibitors on cell proliferation and cell survival. Furthermore, SDS-PAGE electrophoresis and Western blot were chosen as techniques, in order to determine the protein consistency of the two cell lines used. Indeed, the Western blot results showed that the two cell lines do have a difference in protein consistency, regarding proteins that participate in the PI3K-Akt-mTOR pathway. Thus, these results excuse the findings of the SRB assay which are that the inhibitors act differently between the two cell lines. The results of this study could be considered as the base of further investigation on the way these inhibitors can treat types of Thyroid cancer.

Περιεχόμενα:

1. <u>Εισαγωγή</u>	
1.1 Θυρεοειδής αδένας.....σελ:7	
1.2 Καρκίνος.....σελ:8	
1.3 Προδιάθεση Καρκίνου και Σύνδρομα.....σελ:9	
1.4 Συμπτώματα Καρκίνου.....σελ:10	
1.5 Καρκίνος του θυρεοειδούς αδένος.....σελ:11	
1.6 Θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένοςσελ:11	
1.7 Σηματοδοτικά μονοπάτια στον καρκίνο του θυρεοειδούς	
1.7.1 Akt κινάση/PKB, δομή και ρόλος.....σελ:13	
1.7.2 mTOR και σύμπλοκα mTORC1/mTORC2.....σελ:13	
1.7.3 PI3K.....σελ:15	
1.7.4 PTEN.....σελ:15	
1.7.5 Gβ1.....σελ:16	
1.7.6 p90/RSK2.....σελ:16	
1.7.7 p70/S6K.....σελ:17	
2. <u>Υλικά και Μέθοδοι</u>	
2.1 Καρκινικές σειρές 8505C και PTC.....σελ:17	
2.2 mTOR αναστολείς.....σελ:17	
2.3 Καλλιέργεια κυττάρων.....σελ:21	
2.4 Ψήξη Κυττάρων.....σελ:22	
2.5 Απόψυξη κυττάρων.....σελ:25	
2.6 Έλεγχος Κυτταροτοξικότητας-Δοκιμασία SRB.....σελ:26	
2.7 Προετοιμασία Λυμάτων από Κύτταρα.....σελ:30	
2.8 Ανάλυση Bradford.....σελ:31	
2.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών-SDS PAGE.....σελ:32	
2.10 Western Blotσελ:34	
3. <u>Αποτελέσματα</u>	
3.1 SRB Assay.....σελ:37	
3.2 Western Blot ανάλυση.....σελ:41	
4. <u>Συμπεράσματα-Συζήτηση Αποτελεσμάτων</u>σελ:43	
5. <u>Βιβλιογραφία</u>σελ:44	

1. Εισαγωγή

1.1 Θυρεοειδής Αδένας

Ο θυρεοειδής αδένας αποτελεί το μεγαλύτερο ενδοκρινή αδένα του σώματος και το σχήμα του προσομοιάζει με αυτό της πεταλούδας. Αποτελείται από δύο λοβούς (δεξιό και αριστερό). Οι δύο λοβοί ενώνονται μεταξύ τους μέσω του ισθμού. Ο θυρεοειδής αδένας βρίσκεται μπροστά από την τραχεία και οι δύο λοβοί του εκατέρωθεν αυτής. Σε ορισμένους ανθρώπους υπάρχει και ένας τρίτος λοβός, ο πυραμοειδής, ο οποίος προεκβάλλει από τον ισθμό και προς τα πάνω (εικόνα 1), [2]. Τα κύρια εκκριτικά κύτταρα του θυρεοειδούς είναι τα θυλακικά κύτταρα [1].

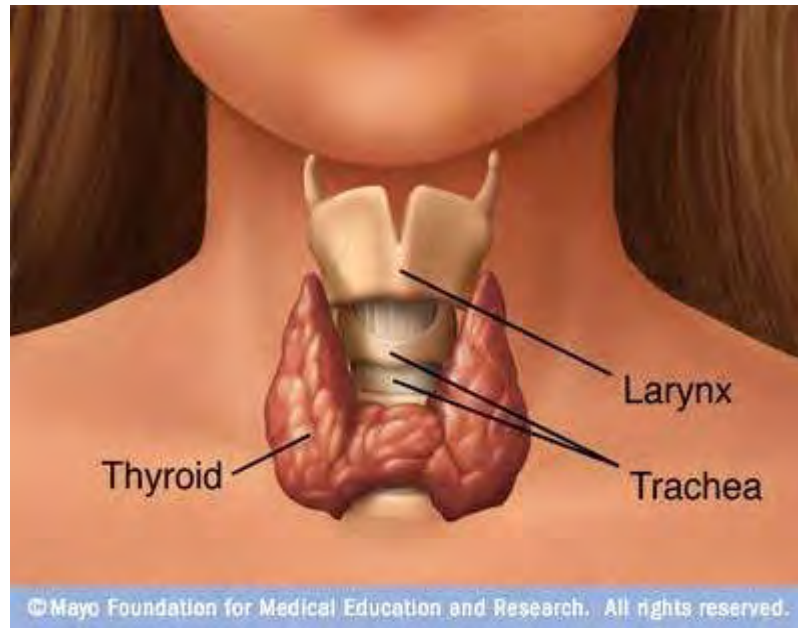
Ο θυρεοειδής αδένας παράγει τρεις ορμόνες:

1. Τη Θυροξίνη ή Τετραϊωδοθυρονίνη (T₄)
2. Την Τριϊωδοθυρονίνη (T₃), η οποία μαζί με την T₄ ρυθμίζει το μεταβολισμό ολόκληρου του οργανισμού. Αυτές οι δύο ορμόνες αναφέρονται μαζί και ως θυρεοειδική ορμόνη [1]
3. Την Καλσιτονίνη, που ρυθμίζει την ομοιόσταση του ασβεστίου [1]

Η έκκριση αυτών των ορμονών ρυθμίζεται από την TSH (θυρεοειδοτρόπος ορμόνη) που παράγεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης.

Η TSH είναι υπεύθυνη και για τη διατήρηση της δομής του θυρεοειδούς αδένα. Απουσία της ο αδένας ατροφεί και εκκρίνει τις ορμόνες του με πολύ χαμηλό ρυθμό. Αντίθετα, όταν ο αδένας υπερδιεγείρεται από την TSH υπερτρέφεται (αύξηση μεγέθους των θυλακικών κυττάρων) και υπερπλάσσεται (αυξάνεται ο αριθμός των θυλακικών κυττάρων) [1].

Η έκκριση της TSH ρυθμίζεται από την TRH, την εκλυτική ορμόνη της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης. Η θυρεοειδική ορμόνη όμως εμποδίζει την έκκριση της TSH δρώντας ανασταλτικά στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και στον υποθάλαμο. Αυτή η αρνητική ανάδραση τείνει να διατηρεί σταθερά τα επίπεδα έκκρισης της θυρεοειδικής ορμόνης.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της τοποθέτησης και της δομής του θυρεοειδούς αδένος [2].

Προκειμένου να συντεθούν οι θυρεοειδικές ορμόνες απαιτείται ιώδιο. Το ιώδιο προσλαμβάνεται από την τροφή και συγκεντρώνεται στον θυρεοειδή αδένος.

1.2 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μια παθολογική κατάσταση. Είναι επίσης γνωστός ως κακοήθης όγκος ή κακοήθης νεόπλασμα. Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από αφύσικο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με πιθανότητα εξάπλωσης των παθολογικών κυττάρων και σε άλλα μέρη του σώματος μέσω μετάστασης [6],[7]. Φυσιολογικά τα κύτταρα επιτελούν περίπου 40 κυτταρικές διαιρέσεις πριν οδηγηθούν σε απόπτωση. Τα καρκινικά κύτταρα ξεπερνούν αυτό το κατώφλι του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους. Ως αποτέλεσμα αυτού, δημιουργείται μια μάζα κυττάρων γνωστή και ως όγκος. Υπάρχουν καλοήθεις και κακοήθεις όγκοι. Οι καλοήθεις όγκοι δε προκαλούν μεταστάσεις, σε αντίθεση με τους κακοήθεις [7].

Τα καρκινικά κύτταρα επιφέρουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Μερικά από αυτά είναι:

- i. Πολλαπλασιασμός παρουσία ή και απουσία αυξητικών παραγόντων
- ii. Αντίσταση στην απόπτωση
- iii. Αντίσταση σε σήματα που αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό
- iv. Αντίσταση στον μηχανισμό γήρανσης
- v. Αγγειογένεση που βοηθά στην αιμάτωση τους

Οι μεταλλάξεις αποτελούν τον κύριο λόγο που ένα κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό κύτταρο. Αλλαγές στο γονιδίωμα των κυττάρων μπορούν να οδηγήσουν στην υπερέκφραση ογκογονιδίων ή στην αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τέτοιες εξαλλαγές στα κύτταρα μπορούν να προκληθούν από τη διατροφή, τον τρόπο ζωής, την έκθεση σε καρκινογόνους παράγοντες και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η UV ακτινοβολία.

1.3 Προδιάθεση Καρκίνου και Σύνδρομα

Το 10% των καρκίνων προκύπτουν μέσω κληρονομήσιμων μεταλλάξεων σε συγκεκριμένες ομάδες γονιδίων, που ονομάζονται γονίδια με προδιάθεση εμφάνισης καρκίνου. Άτομα με μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια έχουν υψηλές πιθανότητες να εμφανίσουν καρκίνο. Πλέον, ταυτοποιούνται όλο και περισσότερα από αυτά τα γονίδια. Επίσης, μελετώνται και μεταλλάξεις σε γαμετικά κύτταρα, οι οποίες τελικά οφείλονται για κάποια είδη καρκίνου. Ο εντοπισμός αυτών των μεταλλάξεων είναι μείζονος σημασίας για καλύτερη εξατομικευμένη θεραπεία ασθενών [14].

Παρακάτω αναγράφονται γνωστά σύνδρομα που οδηγούν στην εμφάνιση καρκίνου.

1. Lynch syndrome: αποτελεί ένα κληρονομήσιμο σύνδρομο, με μενδελικό, αυτοσωμικό, επικρατή τρόπο κληρονομησης. Άτομα με το σύνδρομο έχουν υψηλότερες πιθανότητες να εμφανίσουν συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του ενδομητρίου, των ωοθηκών και καρκίνοι της λαιμικής γαστρεντερικής οδού. Το σύνδρομο οφείλεται σε μεταλλάξεις συγκεκριμένων γονιδίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA (Mismatch repair-MMR). Ονομαστικά, αυτά τα γονίδια είναι τα *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* και *PMS2*. Πρόσφατα έχει ανακαλυφθεί ότι και το γονίδιο *EPCAM* συνδέεται με αυτό το σύνδρομο [14].
2. HBOC (Hereditary Breast and Ovarian Cancer) syndrome: Μεταλλάξεις στα *BRCA* γονίδια, που συμμετέχουν σε επιδιορθώσεις διπλών ρήξεων στην αλυσίδα του DNA, οφείλονται για την εμφάνιση καρκίνου των ωοθηκών και καρκίνου του μαστού. Αυτά τα γονίδια κληρονομούνται με αυτοσωμικό, επικρατή τρόπο. Γαμέτες με μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια είναι πιθανό να οδηγήσουν σε καρκίνο των ωοθηκών και καρκίνο του μαστού σε ποσοστό 50% και 80% αντιστοίχως [14].
3. Li-Fraumeni Syndrome (LFS): Το LFS αποτελεί ένα σπάνιο σύνδρομο και άτομα με αυτό εμφανίζουν πιο συχνά κάποιες μορφές καρκίνου σε

σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό. Οι μορφές καρκίνου που παρατηρούνται συνήθως είναι:

Καρκίνος του μαστού
Καρκίνος των επινεφριδίων
Λευχαιμίες
Οστεοσάρκωμα
Σάρκωμα μαλακών ιστών

Σε οικογένειες που εμφανίζουν αυτό το σύνδρομο σημειώνονται μεταλλάξεις στα γονίδια *CHEK2* και *TP53*. Φυσιολογικά, το *TP53* δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, δηλαδή παίζει ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής διαίρεσης. Μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο οδηγούν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σαφώς, περιβαλλοντικοί παράγοντες, εκτός από τους γενετικούς παράγοντες, επηρεάζουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου σε άτομα με μεταλλάξεις στο *TP53* γονίδιο. Έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο *CHEK2* σε κάποια άτομα με LFS. Και αυτό το γονίδιο, όπως το *TP53*, έχει φυσιολογικά ογκοκατασταλτική δράση. Βέβαια, ακόμη δεν είναι ξεκάθαρο αν αυτές οι μεταλλάξεις του *CHEK2* γονιδίου προκαλούν συμπτώματα του συνδρόμου ή αυξάνουν απλά την πιθανότητα εμφάνισης συγκεκριμένων τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού. Τα γονίδια αυτά κληρονομούνται με αυτοσωμικό, επικρατή τρόπο [15].

1.4 Συμπτώματα Καρκίνου

Υπάρχουν κάποια συμπτώματα που προκαλούνται λόγω καρκίνου. Αυτά είναι τα εξής:

- i. Νέα εξογκώματα
- ii. Αφύσικη αιμορραγία
- iii. Παρατεταμένος βήχας
- iv. Ανεξήγητη απώλεια βάρους και
- v. Αλλαγή στις κενώσεις του εντέρου [8]

Σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 100 διαφορετικοί τύποι ανθρώπινου καρκίνου [7].

Ο καρκίνος είναι ιδιαίτερα σοβαρό πρόβλημα υγείας σε όλο τον κόσμο και ιδιαίτερα τον ανεπτυγμένο. Αποτελεί, σύμφωνα με στατιστικές έρευνες, τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Ο καρκίνος εμφανίζεται συνήθως σε άτομα μεγάλης σχετικά ηλικίας. Παρόλα αυτά, υπάρχουν κάποιες μορφές που εμφανίζονται και σε νεαρά άτομα, ακόμη και παιδιά.

1.5 Καρκίνος του Θυρεοειδούς αδένα

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί μια σπάνια μορφή καρκίνου. Εμφανίζεται στον θυρεοειδή αδένα, όπως υποδηλώνει και το όνομά του, ενός μικρού αδένα στη βάση του λαιμού.

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς εμφανίζεται κυρίως σε άτομα κοντά στην ηλικία των 30 ετών και σε άτομα άνω των 60 ετών. Αξίζει να σημειωθεί πως εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες από ότι στους άνδρες.

Αυτός ο τύπος καρκίνου συνήθως θεραπεύεται, και μπορεί να υπάρξει και ολική αποκατάσταση των ασθενών. Παρόλα αυτά, υπάρχει πιθανότητα επανεμφάνισής του. [1]

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς υπάρχει σε τέσσερις βασικές μορφές. Αυτές είναι οι εξής:

1. **Θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς αδένα** (Papillary carcinoma,-PTC): - η πιο συνήθης μορφή, αφορά στις 8 από τις 10 περιπτώσεις καρκίνου του θυρεοειδούς. Συνήθως εμφανίζεται σε ασθενείς κάτω των 40 ετών, κυρίως σε γυναίκες.
2. **Θυλακιώδες καρκίνωμα** (Follicular carcinoma): έχει συχνότητα 1 στις 10 περιπτώσεις καρκίνου του θυρεοειδούς και εμφανίζεται συνήθως σε μεσήλικες, κυρίως σε γυναίκες.
3. **Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς** (Medullary thyroid carcinoma): αυτή η μορφή είναι υπεύθυνη για λιγότερο από μία στις 10 περιπτώσεις ασθενών. Σε αντίθεση με τις άλλες μορφές, εμφανίζει κληρονομικότητα.
4. **Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς** (Anaplastic thyroid carcinoma-ATC): Η πιο σπάνια αλλά και πιο σοβαρή μορφή. Συναντάται σε ποσοστό 2% και προσβάλλει συνήθως άτομα άνω των 60 ετών. [6]

1.6 Θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα

i. Χειρουργική επέμβαση:

Η χειρουργική επέμβαση είναι μια αποτελεσματική θεραπεία για τον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα και δε προκαλεί συνήθως παρενέργειες, ιδίως αν εκτελεστεί από πεπειραμένους χειρουργούς.

Παρόλα αυτά, η ουλή που παραμένει στον λαιμό του ασθενούς προκαλεί αισθητική δυσφορία στον ασθενή. Υπάρχουν, όμως, νέες προσεγγίσεις με τις οποίες αποφεύγεται αυτό το πρόβλημα. Παραδείγματος χάριν, σε ενδοσκοπική εγχείρηση, ο χειρουργός επεμβαίνει στον θυρεοειδή αδένα με τη χρήση λεπτών,

μακρυνών χειρουργικών εργαλείων μέσω μικρών τομών, αντί να δημιουργηθεί μια μεγάλη τομή [4].

ii. Χημειοθεραπεία

Στη χημειοθεραπεία χρησιμοποιούνται αντικαρκινικά φάρμακα, η χορήγηση των οποίων είναι συνήθως ενδοφλέβια, ενδομυϊκή ή από του στόματος. Η χημειοθεραπεία είναι μια συστηματική μορφή θεραπείας. Αυτό σημαίνει πως το φάρμακο εισέρχεται της συστηματικής κυκλοφορίας με τελικό στόχο τα καρκινικά κύτταρα.

Η χημειοθεραπεία είναι σπάνια ωφέλιμη για τον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα αλλά ευτυχώς δεν απαιτείται τις περισσότερες φορές. Συνδυάζεται με ακτινοθεραπεία για τον αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα-ATC [5].

iii. Στοχεύουσες θεραπείες

Γενικά οι ασθενείς με καρκίνο του θυρεοειδούς δεν ανταποκρίνονται επαρκώς στη χημειοθεραπεία. Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη αποτελεσματικών αντικαρκινικών φαρμάκων για τον καρκίνο του θυρεοειδούς. Πιο αναλυτικά, αυτά τα φάρμακα επιτίθενται εξειδικευμένα στα καρκινικά κύτταρα. Αυτού του είδους τα φάρμακα χρησιμοποιούνται συνήθως σε περιπτώσεις όπου δεν δρουν τα καθιερωμένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα προκαλώντας λιγότερες παρενέργειες.

Αναστολείς Κινασών: Μια ομάδα αντικαρκινικών φαρμάκων για τον καρκίνο του θυρεοειδούς μπορεί και στοχεύει μεταλλάξεις συγκεκριμένων γονιδίων, όπως το *BRAF* και το *RET/PTC*. Πολλά από αυτά τα φάρμακα επηρεάζουν και την ανάπτυξη των καρκινικών αιμοφόρων αγγείων.

Σε πολλούς θηλώδεις καρκίνους του θυρεοειδούς (Papillary Thyroid Cancer-PTC), τα κύτταρα εμφανίζουν πολλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRAF*, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό τους. Κάποια φάρμακα που βρίσκονται υπό μελέτη και που στοχεύουν αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του συγκεκριμένου γονιδίου είναι τα α) vemurafenib (Zelboraf®), β) dabrafenib (Tafinlar®), και γ) selumetinib.

Ραδιενεργό Ιώδιο: Χορήγηση του ραδιενεργού ισότοπου I-131 προκειμένου να καταστραφούν οι πάσχουσες περιοχές του αδένα. Συνήθως χρησιμοποιείται έπειτα από χειρουργική αφαίρεση του αδένα. Οι ασθενείς φθάνουν σε πλήρη ίαση με αυτή τη θεραπεία. Το ραδιενεργό ιώδιο χρησιμοποιείται ως θεραπεία και σε περιπτώσεις υπερθυρεοειδισμού, όπου δεν είναι δυνατή μια χειρουργική επέμβαση ή έχουν αποτύχει εξειδικευμένα φάρμακα [16].

1.7 Σηματοδοτικά μονοπάτια στον καρκίνο του θυρεοειδούς

1.7.1 Akt κινάση/PKB

Οι κινάσες Akt παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Συμμετέχουν σε κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική επιβίωση. Οποιαδήποτε διαταραχή στην δράση τους μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου.

Η Akt έχει βρεθεί να αναστέλλει την αυτοφαγία των κυττάρων, μια φυσιολογική διαδικασία, που οδηγεί στην κυτταροπλασματική αποδόμηση ουσιών και στην ανακύκλωσή τους. Πιο αναλυτικά, η Akt φωσφορυλιώνει και αναστέλλει τη δράση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη διαδικασία της αυτοφαγίας [37].

Υπάρχουν τρεις αναγνωρισμένες ισομορφές της πρωτεΐνης Akt (ή PKB, πρωτεϊνική κινάση B) , οι Akt1, Akt2 και Akt3 [3]. Αυτές οι ισομορφές προκύπτουν από την έκφραση των γονιδίων PKBα, PKBβ και PKBγ αντίστοιχα [17].

Η Akt1 συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι της επιβίωσης του κυττάρου, αναστέλλοντας την απόπτωση. Σε knock down ποντίκια για το γονίδιο της Akt1, παρατηρείται καθυστερημένη αύξηση και αυξημένη απόπτωση σε ιστούς, όπως οι όρχεις και ο θύμος αδένας. Λόγω της αντι-αποπτωτικής της δράσης, η Akt1 έχει συσχετιστεί με πολλούς τύπους καρκίνου.

Η δεύτερη ισομορφή, η Akt2, συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Σε ποντίκια που στερούνται της Akt1, αλλά εκφράζουν την Akt2, η ομοιόσταση της γλυκόζης παραμένει σταθερή. Παρόλα αυτά, τα ζώα είναι μικρότερα από αυτά που εκφράζουν και τις δύο ισομορφές. Επομένως, η Akt1 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη. Αντιθέτως, σε ποντίκια που στερούνται της Akt2 αλλά εκφράζουν την Akt1, εμφανίστηκε διαβήτης. Σε διάφορους καρκινικούς τύπους υπάρχει υπερ-έκφραση των ισομορφών της Akt. Για παράδειγμα, στον καρκίνο των ωοθηκών, του παγκρέατος και του στήθους υπερεκφράζεται η ισομορφή Akt2 ενώ στον γαστρεντερικό καρκίνο υπερεκφράζεται η ισομορφή Akt1.

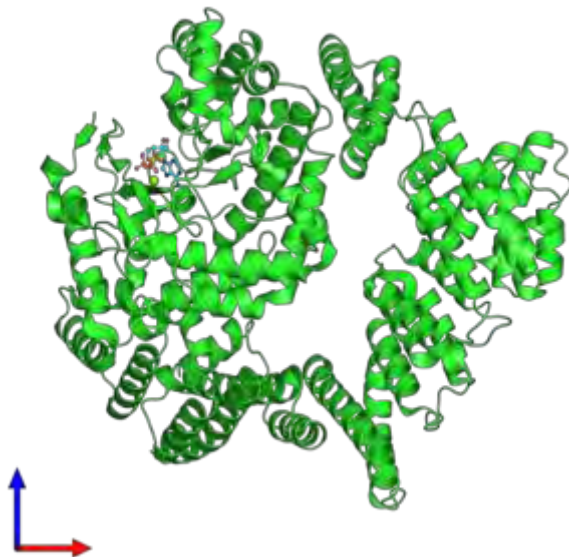
Για τον ρόλο της τρίτης ισομορφής της Akt, την Akt3, οι πληροφορίες είναι περιορισμένες. Εντοπίζεται κυρίως στον εγκέφαλο [3].

1.7.2 mTOR και σύμπλοκα mTORC1/mTORC2

Η κινάση mTOR ανήκει στην οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης, η οποία σχετίζεται με την οικογένεια των PI3K κινασών. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της

mTOR συμμετέχει στην επεξεργασία και εξωτερικών αλλά και εσωτερικών σημάτων και παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως ο μεταβολισμός, ο πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη του κυττάρου και η κυτταρική επιβίωση. Πολλές μεταλλάξεις έκφρασης γονιδίων των υποδοχέων κινασών τυροσίνης, Ras, PI3K και PTEN οδηγούν σε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της mTOR με αποτέλεσμα την εμφάνιση καρκίνου [12]. Η mTOR ανήκει στην υπεροικογένεια IV των PI3Ks κινασών [17].

Η mTOR συνήθως σχηματίζει στο κύτταρο δύο ξεχωριστά πρωτεϊνικά σύμπλοκα που ονομάζονται mTORC1 και mTORC2. Το σύμπλοκο mTORC1 φωσφορυλιώνει άμεσα τη πρωτεϊνική κινάση S6 1 (p70) και τον ευκαρυωτικό παράγοντα 4E-BP1, που παίζουν ρόλο στην μετάφραση των πρωτεϊνών. Αυτές οι δύο πρωτεΐνες παίζουν ρόλο στην μετάφραση των πρωτεϊνών. Το σύμπλοκο mTORC2 ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα. Φωσφορυλιώνει την κινάση επιβίωσης Akt στη σερίνη 473, οδηγώντας σε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Akt, το οποίο παίζει ρόλο σε κυτταρικές αποκρίσεις που σχετίζονται με τον καρκίνο όπως η κυτταρική αύξηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η επιβίωση των κυττάρων, η αυξημένη κυτταρική μετανάστευση και αλλαγές στη γλυκόλυση. Κάποιες μελέτες υποδεικνύουν πως το σύμπλοκο mTORC2 φωσφορυλιώνει την PKCα και ρυθμίζει την οργάνωση του σκελετού ακτίνης [12]. Μελέτες έχουν συσχετίσει την ύπαρξη μεταλλάξεων σε γονίδια του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K-Akt-mTOR με τον καρκίνο του θυρεοειδούς. Πιο αναλυτικά, απώλεια λειτουργίας του γονιδίου *PTEN* ή ενίσχυση της λειτουργίας των γονιδίων *PIK3CA* και *RET* μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση των επιθετικών μορφών καρκίνου του θυρεοειδούς, όπως ο αναπλαστικός καρκίνος του αδένα [40],[41]. Το γονίδιο *PIK3CA* κωδικοποιεί για την υπομονάδα p110α της κινάσης PI3K, ενώ το γονίδιο *RET* κωδικοποιεί για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη-υποδοχέα της οικογένειας κινασών τυροσίνης, που συμβάλλει στην αναγνώριση εξωκυτταρικών σημάτων, όπως αυξητικούς παράγοντες και οδηγεί στην ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος [42], [43]. Αυτά τα δεδομένα καθιστούν το συγκεκριμένο μονοπάτι στόχο για την ανάπτυξη αντικαρκινικών θεραπειών με τη χρήση αναστολέων για μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του mTOR μαζί με ένα μόριο ADP, ένα μόριο MGF και δύο μόρια Mg^{2+} [13].

1.7.3 PI3K

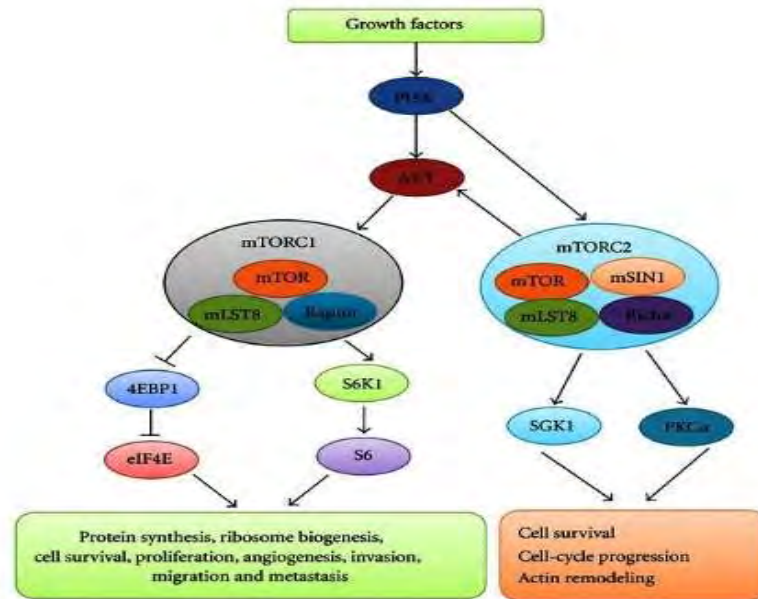
Οι κινάσες 3-φωσφοϊνοσιτιδίου (PIP3) είναι γνωστό πως συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική επιβίωση και η κυτταρική διαφοροποίηση. Οι PI3Ks συμβάλλουν στη μεταβίβαση μηνυμάτων ενδοκυτταρικά από κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, οδηγώντας στην παραγωγή φωσφολιπιδίων, για παράδειγμα PIP3, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν την Akt κινάση και μετέπειτα σηματοδοτικά μονοπάτια. Αυτά τα μονοπάτια συμμετέχουν στην αγγειογένεση, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην κυτταρική επιβίωση και προσκόλληση, καθώς και στην απόκριση στην ινσουλίνη [17], [18]. Γενωμικές μελέτες έχουν δείξει πως πολλά μόρια στο σηματοδοτικό μονοπάτι των PI3Ks επιδέχονται μεταλλάξεις σε γαμετικό ή αυτοσωμικό επίπεδο, με αποτέλεσμα την εμφάνιση πολλών, διαφορετικών μορφών καρκίνου. Αυτά τα αποτελέσματα, καθώς και το γεγονός πως οι

PI3Ks και άλλα σηματοδοτικά μόρια του μονοπατιού αποτελούν εύκολους φαρμακευτικούς στόχους, καθιστούν αυτό το μονοπάτι κατάλληλο στόχο στη θεραπεία του καρκίνου [17].

1.7.4 PTEN

Το φωσφολιπίδιο PIP3 αποτελεί δεύτερο αγγελιοφόρο που παράγεται μέσω της δράσης κινάσων της οικογένειας I των PI3Ks. Η δράση του περιορίζεται από την φωσφατάση PTEN. Πιο αναλυτικά, η PTEN μετατρέπει το PIP3 σε PIP2.

Αναστολή της δράσης της PTEN ή απώλεια αυτής θα οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου, λόγω ανεξέλεγκτης δράσης των PI3Ks [17].



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού PI3K-Akt-mTOR. Όταν ένας αυξητικός παράγοντας προσδεθεί στον υποδοχέα του, τότε ενεργοποιούνται πρωτεΐνες-κινάσες της οικογένειας PI3K. Στη συνέχεια, αυτές οι κινάσες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν Akt πρωτεΐνες. Αυτές με τη σειρά τους θα φωσφορυλιώσουν και θα ενεργοποιήσουν το σύμπλοκο mTORC1 με αποτέλεσμα την ρύθμιση σημαντικών διεργασιών του κυττάρου, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση κλπ. Το σύμπλοκο mTORC2 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Akt [27].

1.7.5 GβI

Η πρωτεΐνη GβI (γνωστή και ως MLST8) αποτελεί υπομονάδα, τόσο του mTORC1 όσο και του mTORC2 και παίζει ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής επιβίωσης ως απόκριση σε ορμονικά και θρεπτικά σήματα [31].

1.7.6 p90/RSK2

Η p90 ή αλλιώς RSK2, είναι μία κινάση Σερίνης-Θρεονίνης που παίζει ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μεταβολισμό και στην κυτταρική αύξηση. Οι RSKs πρωτεΐνες αποτελούν μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού mTOR [32], [33].

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε η ιδιότητα της p90 να φωσφορυλιώνει την υπομονάδα Raptor του συμπλόκου mTORC1 [39].

Η φωσφορυλιωμένη μορφή της p90 είναι η ενεργοποιημένη της μορφή [34].

1.7.7 p70/S6K

Η πρωτεΐνη S6K ή αλλιώς γνωστή ως p70, είναι μια κινάση που φωσφορυλιώνει την υπομονάδα S6 της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας. Το σύμπλοκο mTORC1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την S6K. Η πρωτεΐνη αυτή, συμμετέχει σε πολύ σημαντικές διεργασίες του κυττάρου, όπως η μεταγραφή, η μετάφραση, η σύνθεση λιπιδίων και πρωτεϊνών, η κυτταρική αύξηση και ο κυτταρικός μεταβολισμός [35].

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Καρκινικές σειρές 8505C και PTC

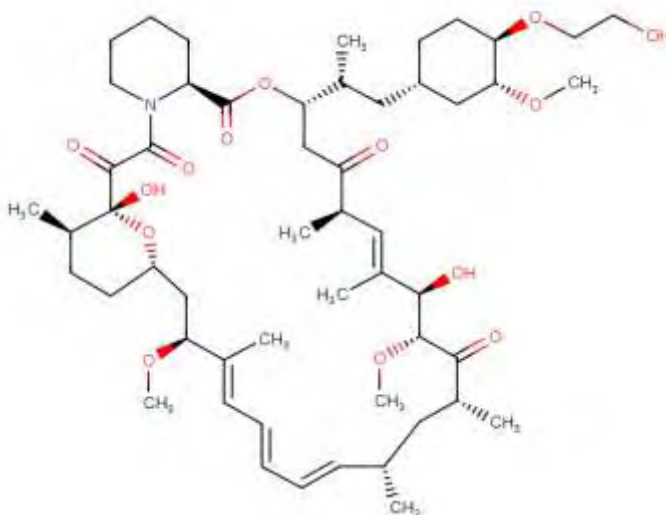
Σε αυτή τη διπλωματική άσκηση χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές, η 8505C και η PTC.

- PTC: Αυτή η κυτταρική σειρά απομονώθηκε από ασθενή του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών [36]. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε RPMI 1640 με περιεκτικότητα 5% FBS.
- 8505C: Αυτή η κυτταρική σειρά απομονώθηκε το 1984 από μια ασθενή με καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος, ηλικίας 78 ετών [10]. Αυτά τα κύτταρα προκαλούν αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος-ATC [11]. Πλέον είναι μια εμπορική κυτταρική σειρά. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε RPMI 1640 με περιεκτικότητα 5% σε FBS.

2.2 mTOR αναστολείς

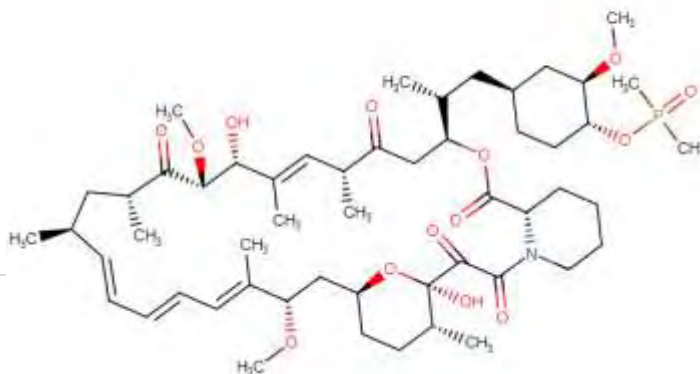
- Everolimus-(RAD-001): το Everolimus είναι χημικό ανάλογο της ραπαμικίνης και δρα ως αναστολέας του mTOR, αποκλειστικά στο σύμπλοκο mTORC1, και όχι στο mTORC2, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της mTOR. Με αυτό το τρόπο, τα κύτταρα δε μπορούν να μεταβούν από την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου στην S και οδηγούνται σε απόπτωση. Αποτέλεσμα της αναστολής της mTOR από το Everolimus είναι η μείωση του ρυθμού του κυτταρικού

πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης και της πρόσληψης γλυκόζης από τα κύτταρα [19], [22]. Το Everolimus είναι εγκεκριμένο από τον FDA και χρησιμοποιείται στη φαρμακευτική αντιμετώπιση κάποιων μορφών καρκίνων, όπως ο καρκίνος των επινεφριδίων και ο καρκίνος του μαστού [20].



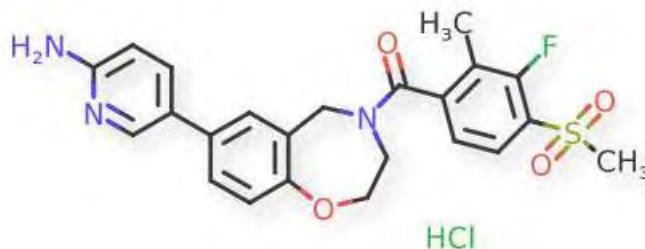
Εικόνα 4: Χημική δομή του Everolimus (RAD-001). Η ουσία αυτή ανήκει στην οικογένεια των μακρολιδικών λακταμών. Αυτά τα μόρια εμπεριέχουν κυκλικές εστερικές ομάδες και κυκλικά αμίδια [23].

- Deforolimus-(AP23573): το Deforolimus αποτελεί ανάλογο της Ραπαμυκίνης αλλά όχι προφάρμακο. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει πως αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πολλούς καρκινικούς τύπους, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* [21]. Πιο συγκεκριμένα, αναστέλλει την κινάση mTOR [22].



Εικόνα 5: Χημική δομή της ουσίας Deforolimus (AP23573). Η ουσία αυτή ανήκει στην οικογένεια των μακρολιδικών λακταμών. Αυτά τα μόρια εμπεριέχουν κυκλικές εστερικές ομάδες και κυκλικά αμίδια [22].

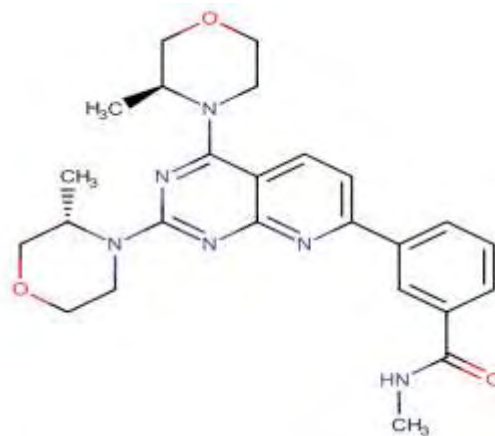
- XL388: αυτή η ουσία είναι ένας ATP ανταγωνιστής των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 της mTOR κινάσης. Ενδοκυτταρικά, η XL388 παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων υποστρωμάτων αυτών των συμπλόκων, όπως των p70/S6K και 4E-BP1 του συμπλόκου mTORC1, και της Akt του mTORC2. *In vitro*, η XL388 είναι κυτταροτοξική σε καρκινικές σειρές από συμπαγείς όγκους και αιμοποιητικές καρκινικές σειρές. Μπορεί να δράσει επίσης ενισχυτικά με χημειοθεραπευτικά φάρμακα [24].



Εικόνα 6: Χημικός τύπος της ουσίας XL388 διαλυμένης με HCl [24].

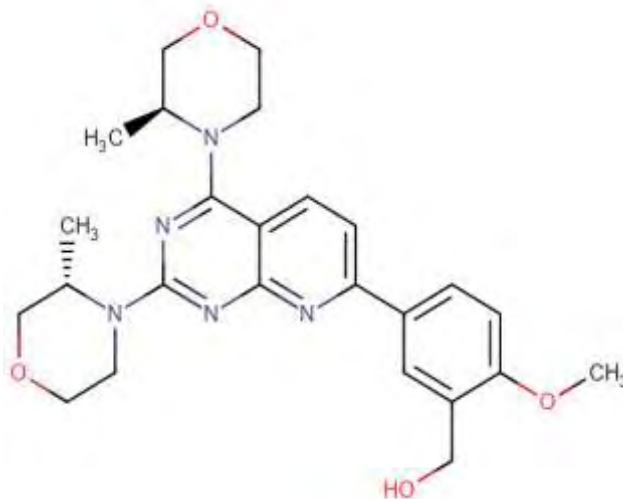
- AZD2014-Vistusetriib: αυτή η ουσία αποτελεί ισχυρό αναστολέα των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2. Πιο αναλυτικά, είναι ένας ATP ανταγωνιστής. Η δράση του έχει δοκιμαστεί για έναν μεγάλο αριθμό κινασών που συγκαταλέγονται στην οικογένεια PI3Ks και έχει αποδειχθεί πως έχει υψηλή επιλεκτικότητα για αυτές [25]. Το AZD2014 ανήκει στην οικογένεια των φαινυλπυριδινών. Οι φαινυλπυριδίνες είναι αρωματικές

ενώσεις που εμπεριέχουν μια φαινυλική ομάδα συνδεδεμένη με μια πυριδίνη μέσω ενός δεσμού C-C ή C-N [26].



Εικόνα 7: Χημική δομή της ουσίας AZD2014 [26].

- AZD8055: αυτή η χημική ουσία βρίσκεται υπό κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία λεμφωμάτων και άλλων κακοηθειών. Χημικά ανήκει στην οικογένεια των φαινυλπυριδινών [28]. Αυτή η ένωση στοχεύει και τα δύο σύμπλοκα της mTOR (mTORC1 και mTORC2) δρώντας ως ανταγωνιστής του ATP [17].



Εικόνα 8: Χημικός τύπος της ουσίας AZD8055 [28].

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφεται η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος κάθε αναστολέα που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της συγκεκριμένης πτυχιακής.

Αναστολείς	Συγκέντρωση Διαλύματος
Everolimus	10mM
Deforolimus	10mM
XL388	20mM
AZD2014	10mM
AZD8055	20mM

Πίνακας 1: Στον πίνακα αναγράφεται η συγκέντρωση κάθε αρχικού διαλύματος αναστολέα που χρησιμοποιήθηκε.

Όλοι οι αναστολείς είναι διαλυμένοι σε DMSO (Dimethylsulfoxide 99.8%).

2.3 Καλλιέργεια κυττάρων

Όλα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο σε σταθερές συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε εστία νηματική ροής (hood) υπό στείρες συνθήκες. Τόσο τα PTC όσο και τα 8505C αναπτύσσονται προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας (Attached Monolayer Cell Culture).

Χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες των 25cm² και των 75cm² (SPL LIFE SCIENCES) για την καλλιέργεια των κυττάρων.

Το θρεπτικό υλικό για τις καλλιέργειες αποτέλεσε το RPMI 1640 (Gibco®) με 5% περιεκτικότητα σε ορό FBS (Fetal Bovine Serum, Biosera, 1001G/500).

Επιπρόσθετα στο θρεπτικό προστίθενται:

- 1% Αντιβιοτικά (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, Biosera, LOT: 018BS404) και
- 1% L-Γλουταμίνη (Biosera, batch:018BS516), καθώς αυτό το αμινοξύ είναι άκρως απαραίτητο για την ανάπτυξη των κυττάρων.

Μόλις η περιεκτικότητα της φλάσκας σε κύτταρα φθάσει το 80%, γίνεται ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη για την απομάκρυνση τοξικών, μεταβολικών προϊόντων των κυττάρων που απελευθερώνονται στο θρεπτικό υλικό. Επίσης, τα κύτταρα με αυτόν τον τρόπο

διατηρούν το φυσιολογικό τους πρότυπο ανάπτυξης. Αναλυτικά, τα βήματα αυτής της διαδικασίας είναι:

- i. Απομάκρυνση του παλιού θρεπτικού από τις φλάσκες.
- ii. Ξέπλυμα του εσωτερικού της φλάσκας με NaCl 0,9% (φυσιολογικός ορός) προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα θρεπτικού υλικού.
- iii. Προσθήκη θρυψίνης 1X (Biosera, XC – T1717, έγινε αραίωση του αρχικού stock 10X με NaCl 0.9%) 1ml σε φλάσκα 25cm² και 2ml σε φλάσκα 75cm². Η θρυψίνη θα συμβάλλει στο σπάσιμο των δεσμών που κρατούν τα κύτταρα προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας.
- iv. Τοποθέτηση των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο για 5 λεπτά.
- v. Παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί ότι έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια της φλάσκας.
- vi. Στην εστία νηματικής ροής, γίνεται μεταφορά της θρυψίνης που περιέχει πλέον τα κύτταρα της φλάσκας σε falcon (CORNING, REF:430766, sterile) 15ml.
- vii. Γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού στο falcon προκειμένου να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη.
- viii. Η ποσότητα των κυττάρων μοιράζεται εξίσου στην παλιά φλάσκα και σε μια καινούργια. Αν οι φλάσκες που χρησιμοποιούνται είναι αυτές των 25cm², τότε ο τελικός όγκος θρεπτικού πρέπει να είναι 5-7ml. Αν χρησιμοποιούνται φλάσκες των 75cm², τότε ο τελικός όγκος θρεπτικού είναι 10-12ml.

Με αυτή τη διαδικασία δίνεται η δυνατότητα στα κύτταρα να αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς.

Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται συνήθως μία με δύο φορές την εβδομάδα, ανάλογα με τον ρυθμό ανάπτυξης της κάθε κυτταρικής σειράς.

Σε περίπτωση που το θρεπτικό υλικό μεταβολιστεί από τα κύτταρα αλλά αυτά δε καλύπτουν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας, τότε γίνεται απλά μια ανανέωση στο θρεπτικό υλικό. Επομένως, στην εστία νηματικής ροής, απομακρύνεται το μεταβολισμένο θρεπτικό υλικό και γίνεται προσθήκη κατάλληλου όγκου καινούργιου θρεπτικού υλικού. Η ανανέωση θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται συνήθως κάθε δύο μέρες.

2.4 Ψύξη Κυττάρων

Για τη διατήρηση και αποθήκευση των κυτταρικών σειρών για μελλοντική χρήση ακολουθείται η διαδικασία της κρυοσυντήρησης. Τα βήματα της διαδικασίας αυτής είναι:

- i. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων στην εστία νηματικής ροής.

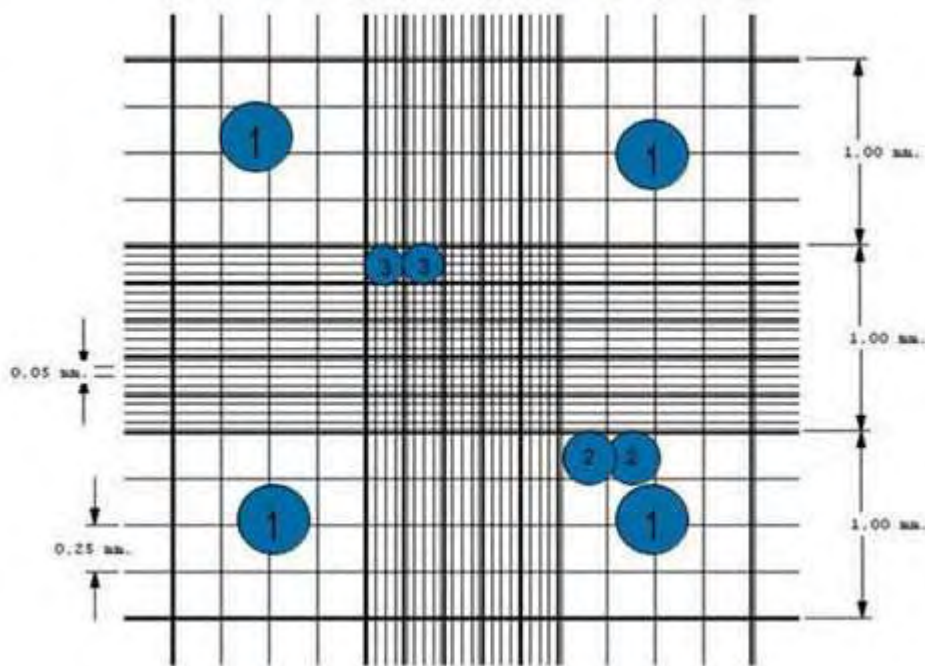
- ii. Ξέπλυμα του εσωτερικού της φλάσκας με NaCl 0,9% (φυσιολογικός ορός) για να απομακρυνθούν υπολείμματα του θρεπτικού υλικού.
- iii. Προσθήκη θρυψίνης 1X 1ml σε φλάσκα 25cm² και 2ml σε φλάσκα 75cm² με σκοπό να ανασηκωθούν από την επιφάνεια της φλάσκας τα προσκολλημένα κύτταρα.
- iv. Επώαση των κυττάρων με θρυψίνη 1X για 5 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο.
- v. Παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί ότι έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια της φλάσκας.
- vi. Τοποθέτηση των κυττάρων που βρίσκονται διαλυμένα στη θρυψίνη σε falcon 15ml στην εστία νηματικής ροής.
- vii. Προσθήκη θρεπτικού υλικού για αδρανοποίηση της θρυψίνης. Μέχρι στιγμής η διαδικασία είναι ίδια με αυτή της ανακαλλιέργειας των κυττάρων.
- viii. Από το falcon απομονώνεται ποσότητα 90μl με αποστειρωμένη πιπέτα 1000μl και αναμειγνύεται με Trypan Blue 0.4% (w/v) 10μl που απομονώθηκε με αποστειρωμένη πιπέτα 20μl σε erpendorf 1,5 ml. Με αυτό τον τρόπο και τη χρήση πλάκας Neubauer θα γίνει καταμέτρηση των κυττάρων που έχουμε απομονώσει στο falcon.

Η πλάκα Neubauer που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα αιμοκυτταρόμετρο και αποτελείται από μία παχιά γυάλινη πλάκα με μία κεντρική και τέσσερις περιφερικές περιοχές σχεδιασμένες για την καταμέτρηση. Πάνω στην παχιά γυάλινη πλάκα τοποθετείται η καλυπτρίδα για να καλυφθεί η επιφάνεια της πλάκας καταμέτρησης. Στο κενό που δημιουργείται στο πάνω μέρος συνένωσης της παχιάς πλάκας με την καλυπτρίδα, τοποθετούνται 20-25μl του κυτταρικού αναιωρήματος με Trypan Blue 0.4% (w/v). Αξίζει να σημειωθεί πως το Trypan Blue 0.4% (w/v) είναι μια χρωστική που βάφει μπλε τα νεκρά κύτταρα και την επιφάνεια της πλάκας Neubauer, με αποτέλεσμα τα ζωντανά κύτταρα να παραμένουν άσπρα και να καταμετρώνται. Στη συνέχεια, η πλάκα παρατηρείται σε οπτικό μικροσκόπιο και γίνεται μέτρηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων που απομονώθηκαν. Ο αριθμός των κυττάρων προκύπτει από την μέτρηση κυττάρων που βρίσκονται στις περιφερικές περιοχές της πλάκας, πιο συγκεκριμένα σε χώρους εκατέρωθεν του κεντρικού σταυρού της πλάκας (κεντρική περιοχή). Ο αριθμός που προκύπτει πρέπει να αναχθεί με κατάλληλη εξίσωση στον πραγματικό αριθμό ζωντανών κυττάρων που απομονώθηκαν από την καλλιέργεια. Ο τύπος που χρησιμοποιείται είναι:

$$\frac{\chi}{4} \times 10^4 = \text{αριθμός κυττάρων στο } 1\text{ml}$$

Όπου χ ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκε με τη χρήση της πλάκας Neubauer.

Με αυτή την εξίσωση βρίσκουμε τον αριθμό των κυττάρων σε 1ml. Στο falcon, όμως, όπου έχουμε απομονώσει τα κύτταρα από την αρχική καλλιέργεια, ο τελικός όγκος είναι >1ml. Άρα, ο αριθμός των κυττάρων στο falcon, δηλαδή και της αρχικής καλλιέργειας, είναι ίσος με τον αριθμό των κυττάρων στο 1ml x τον τελικό όγκο θρεπτικού στο falcon.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση μιας πλάκας Neubauer. Διακρίνεται η κεντρική περιοχή- Σταυρός και οι περιφερικές περιοχές εκατέρωθεν αυτής όπου γίνεται η καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων μιας καλλιέργειας [29].

- ix. Αφού υπολογίσουμε τον αριθμό των κυττάρων της καλλιέργειας, κάνουμε φυγοκέντρηση στις 1.200 στροφές για 5 λεπτά. Έπειτα, επιστρέφουμε στην εστία νηματικής ροής, όπου και απορρίπτουμε το υπερκείμενο υγρό. Πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή προκειμένου να μην απορριφθεί και το pellet των κυττάρων που έχει σχηματιστεί. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, σπάμε το pellet κυττάρων.

- x. Γίνεται προσθήκη στο falcon διαλύματος κρυοσυντήρησης που περιέχει 10% DMSO (Dimethylsulfoxide 99.8%) και 90% FBS. Αυτό το διάλυμα ονομάζεται *Freezing medium*. Συνήθως σε κάθε cryovial (ειδικές κάψουλες ψύξης κυττάρων, CryoPure, LOT:8083611) περιέχονται περίπου 5×10^6 κύτταρα και 1ml *Freezing medium*. Αν στο falcon με τα κύτταρα της καλλιέργειας υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων, τότε προστίθεται ανάλογη ποσότητα *freezing medium* και έπειτα αυτό διαμοιράζεται σε ανάλογο αριθμό cryovials.
- xi. Αφού έχει προστεθεί 1ml *Freezing medium* που περιέχει περίπου 5×10^6 κύτταρα σε κάθε cryovial, τοποθετούμε τα cryovial σε ειδικό δοχείο με ισοπροπανόλη. Η ισοπροπανόλη βοηθά στη σταδιακή ψύξη των κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγουμε την καταστροφή τους. Το δοχείο με την ισοπροπανόλη τοποθετείται στους -80°C .

2.5 Απόψυξη κυττάρων

Για την απόψυξη των κυττάρων που βρίσκονται αποθηκευμένα στους -80°C ακολουθείται ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο. Πιο αναλυτικά:

- i. Βρίσκουμε τη θέση των κυττάρων που θέλουμε να αποψύξουμε στους -80°C .
- ii. Μόλις βγάλουμε τα κύτταρα από τους -80°C , τα τοποθετούμε εσπευσμένα στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C και αναδεύουμε τα cryovial.
- iii. Έπειτα, αφού ξεπαγώσει το *Freezing medium*, πηγαίνουμε στην εστία νηματικής ροής.
- iv. Εκεί, με αποστειρωμένη πιπέτα των 1000μl, μεταφέρουμε το *Freezing medium* με τα κύτταρα σε falcon των 15ml.
- v. Προσθέτουμε σταδιακά, με αργό ρυθμό, 10ml RPMI 1640 5% FBS.
- vi. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στις 900 στροφές για 10 λεπτά.
- vii. Επιστρέφουμε στην εστία νηματικής ροής όπου απορρίπτουμε το υπερκείμενο υγρό. Δε πρέπει να απορριφθεί το pellet των κυττάρων που έχει σχηματιστεί.
- viii. Αφού έχει απομακρυνθεί όλο το υπερκείμενο υγρό, σπάμε το pellet των κυττάρων.
- ix. Τα κύτταρα που μόλις έχουν ξεπαγώσει, καλλιεργούνται αρχικά σε RPMI 20%, προκειμένου να αναπτυχθούν πιο γρήγορα. Έτσι, αν πρόκειται να καλλιεργήσουμε τα κύτταρα σε φλάσκα 25cm^2 , προσθέτουμε στο falcon με το pellet των κυττάρων 4,25ml RPMI 5%, μεταφέρουμε τα κύτταρα στη φλάσκα των 25cm^2 και προσθέτουμε 750μl FBS. Έτσι ο τελικός όγκος του

Θρεπτικού στη φλάσκα είναι 5ml, με περιεκτικότητα 20% σε FBS. Αν πρόκειται να χρησιμοποιήσουμε φλάσκα των 75cm² ακολουθείται η ίδια διαδικασία, μόνο που στο falcon με το pellet των κυττάρων προσθέτουμε 8,5ml RPMI 5%, μεταφέρουμε τα κύτταρα στη φλάσκα και προσθέτουμε 1,5ml FBS. Ο τελικός όγκος στη φλάσκα θα είναι 10ml RPMI 20%.

2.6 Έλεγχος Κυτταροτοξικότητας-Δοκιμασία SRB

Η δοκιμασία με SRB (Sulforhodamine B) χρησιμοποιείται για εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης ουσιών. [30]. Η διαδικασία αποτελείται από τα εξής βήματα:

1^η Μέρα:

Ανανέωση θρεπτικού υλικού στη φλάσκα των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν για πείραμα.

2^η Μέρα:

Τα κύτταρα θα πρέπει να βρίσκονται στη λογαριθμική βάση ανάπτυξης. και ακολουθούνται τα πρώτα 8 βήματα που αναλύθηκαν στη διαδικασία ψύξης των κυττάρων.

Σε αυτή τη δοκιμασία, χρησιμοποιούμε 96 well-ELISA plates. Αξίζει να σημειωθεί πως ο πάτος των wells πρέπει να είναι επίπεδος. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν από κάθε ουσία.

Αναστολείς	Συγκεντρώσεις και επαναλήψεις κάθε συγκέντρωσης για κάθε αναστολέα
Everolimus	100μM x3, 10μM x3, 1μM x3, 0.1μM x3, 0.01μM x3
Deforolimus	100μM x3, 10μM x3, 1μM x3, 0.1μM x3, 0.01μM x3, 0.001μM x3
XL388	100μM x3, 10μM x3, 1μM x3, 0.1μM x3, 0.01μM x3

AZD2014	100μM x3, 10μM x3, 1μM x3, 0.1μM x3, 0.01μM x3, 0.001μM x3
AZD8055	100μM x3, 10μM x3, 1μM x3, 0.1μM x3, 0.01μM x3, 0.001μM x3

Πίνακας 2: Στον πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν για κάθε αναστολέα και ο αριθμός των επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση (x3, δηλαδή τρεις φορές) σε κάθε κυτταρική σειρά. Κάποιοι αναστολείς, όπως το Deforolimus, το AZD2014 και το AZD8055 μελετήθηκαν και για τη συγκέντρωση 0,001μM. Ο λόγος που έγινε αυτό είναι ότι αυτοί οι τρεις αναστολείς είναι πολύ δραστικοί στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Από τον πίνακα 2 προκύπτει πως οι ουσίες Everolimus και XL388 απαιτούν 15 wells έκαστη με κύτταρα, ενώ οι ουσίες Deforolimus, AZD2014 και AZD8055 απαιτούν 18 wells με κύτταρα η κάθε μία. Επίσης, χρειάζονται 6 wells με κύτταρα control, δηλαδή κύτταρα στα οποία δε θα γίνει προσθήκη των ουσιών υπό μελέτη και θα χρησιμοποιηθούν για σύγκριση του ρυθμού ανάπτυξής τους με τα υπόλοιπα κύτταρα. Τέλος, χρειαζόμαστε και 8 wells με κύτταρα Tzero. Στα κύτταρα Tzero θα γίνει αναστολή της ανάπτυξής τους και μονιμοποίηση πριν την προσθήκη των ουσιών που εξετάζονται. Με αυτό τον τρόπο ελέγχεται η κατάσταση και ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων πριν την προσθήκη των ουσιών που μελετώνται. Επομένως, σε κάθε πείραμα χρειαζόμαστε συνολικά 98 wells. Όμως, τα Tzero κύτταρα θα επωαστούν σε δεύτερο plate, καθώς θα μονιμοποιηθούν νωρίτερα από ότι τα υπόλοιπα κύτταρα. Άρα, σε ένα plate θα καλλιεργηθούν κύτταρα μιας κυτταρικής σειράς σε 90 wells και σε ένα δεύτερο plate σε 8 wells.

Ο αριθμός των κυττάρων 8505C και PTC που τοποθετήθηκαν σε κάθε οπή είναι 4.000 και 3.000 κύτταρα αντίστοιχα. Επομένως, για τα 8505C χρειαζόμαστε 4.000 κύτταρα x 120 wells = 480.000 κύτταρα συνολικά, ενώ για τα PTC χρειαζόμαστε 3.000 x 120 wells = 360.000 κύτταρα συνολικά.

Με τη χρήση της Neubauer βρίσκουμε τον αριθμό των κυττάρων που έχουμε απομονώσει από την αρχική καλλιέργεια και στη συνέχεια μεταφέρουμε τον κατάλληλο όγκο θρεπτικού με κύτταρα σε καινούργια falcon, έτσι ώστε να έχουμε 480.000 κύτταρα 8505C και 360.000 κύτταρα PTC. Σε κάθε well θα πρέπει να προσθέσουμε 100μl RPMI με κύτταρα. Άρα ο τελικός όγκος RPMI που απαιτείται για κάθε κυτταρική σειρά είναι 120 wells x 100μl= 12.000 μl ή 12ml. Επομένως, στα falcon όπου θα έχουμε προσθέσει κάποιο όγκο RPMI με 8505C κύτταρα και PTC κύτταρα, θα συμπληρώσουμε με την κατάλληλη ποσότητα RPMI προκειμένου ο τελικός όγκος να είναι 12ml.

Με τη χρήση αποστειρωμένων fintips, τοποθετούμε σε κάθε well 100μl RPMI με 8505C ή PTC που παρασκευάσαμε νωρίτερα.

Τα plates με τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο.

3^η Μέρα:

Αφού στα wells όπου έχουμε προσθέσει κύτταρα υπάρχουν ήδη 100μl RPMI και εμείς θέλουμε οι συγκεντρώσεις των ουσιών να είναι 100μM, 10μM, 1μM, 0.1μM, 0.01μM και 0.001μM, πρέπει να φτιάξουμε αρχικές συγκεντρώσεις ουσιών 200μM, 20μM, 2μM, 0.2μM, 0.02μM και 0.002μM καθώς θα γίνει αραίωση τους μόλις προστεθούν στα wells με τα κύτταρα.

Για το Everolimus ισχύει ότι:

Για τα 200μM: $C1 * V1 = C2 * V2$ (νόμος αραίωσης) με $C1=10mM$ ή $10.000μM$, $C2=200μM$ και $V2=3$ wells που θα έχουν αυτή τη συγκέντρωση της ουσίας x $100μl=300μl$ ή $0,3ml$. Άρα:

$$V1 = C2 * \frac{V2}{C1}$$

$$V1 = 200μM * \frac{300μl}{10.000μM}$$

Άρα $V1=6μl$ από το stock του Everolimus και $300μl-6μl=294μl$ RPMI 5%.

Για τα 20μM: Χρησιμοποιούμε πάλι τον νόμο αραίωσης $C1 * V1 = C2 * V2$ με $C1=200μM$, $C2=20μM$ και $V2=300μl$. Άρα $V1=30μl$ από την πρώτη συγκέντρωση Everolimus που παρασκευάστηκε, καθώς με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνονται διαδοχικές αραιώσεις και δε χρειάζεται κάθε φορά να απομονώνουμε ποσότητα του αναστολέα από το stock, και $300μl-30μl=270μl$ RPMI 5%.

Για τις συγκεντρώσεις των 2μM, 0,2μM και 0,02μM, επειδή προκύπτουν με διαδοχικές αραιώσεις από την αρχική συγκέντρωση, ισχύει ότι $V1=30μl$ από την προηγούμενη συγκέντρωση και 270μl RPMI 5%.

Για τις ουσίες Deforolimus και AZD2014 ισχύουν τα ίδια μόνο που υπάρχει και η συγκέντρωση των 0,002μM.

Για την ουσία XL388 έχουμε:

Για τα 200μM: $C1 * V1 = C2 * V2$ με $C1=20mM$ ή $20.000μM$, $C2=200μM$ και $V2=300μl$.

Άρα $V1=3μl$ XL388 από το αρχικό stock και $300μl-3μl=297μl$ RPMI 5%.

Οι συγκεντρώσεις των 20μM, 2μM, 0,2μM και 0,02μM προκύπτουν με διαδοχικές αραιώσεις και $V1=30μl$ από την προηγούμενη, παραγόμενη συγκέντρωση και $300μl-30μl=270μl$ RPMI 5%.

Το ίδιο ισχύει και για το AZD8055, μόνο που υπάρχει και η συγκέντρωση 0,002μM.

Αφού παρασκευάσουμε όλες τις συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών, γίνεται προσθήκη 100μl κάθε συγκέντρωσης σε ένα well. Κάθε συγκέντρωση έχει τρεις επαναλήψεις, δηλαδή προστίθεται σε τρία wells.

Στα control, γίνεται προσθήκη 100μl μόνο RPMI 5%. Τα plates με τα control και τις ουσίες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για 48 ώρες. Στα Tzero γίνεται προσθήκη 100μl RPMI 5% και ακολουθεί η μονιμοποίηση τους με προσθήκη 50μl TCA 10% (Trichloroacetic acid). Έπειτα, τα Tzero τοποθετούνται στους 4°C για μία ώρα.

Μόλις περάσει η μία ώρα, απορρίπτουμε όλο τον όγκο διαλυμάτων από τα Tzero και τα ξεπλένουμε με ddH₂O. Αφού στεγνώσει το plate των Tzero στον αέρα, αποθηκεύεται στους 4°C.

4^η Μέρα

Αυτή τη μέρα δεν πραγματοποιείται κάποια διαδικασία καθώς μελετάμε τη δράση των ουσιών στις 48 ώρες.

5^η Μέρα

Μόλις περάσουν 48 ώρες από την προσθήκη των ουσιών στα κύτταρα, σταματάμε την επίδρασή τους και μονιμοποιούμε τα κύτταρα προσθέτοντας TCA 10%. Τα plates τοποθετούνται στους 4°C για μία ώρα.

Αφού περάσει η μία ώρα, απορρίπτουμε το TCA και το RPMI των κυττάρων και ξεπλένουμε το plate με ddH₂O και το αφήνουμε να στεγνώσει στον αέρα, σε θερμοκρασία δωματίου.

Όταν στεγνώσει το plate, προσθέτουμε 50μl SRB (Sulforhodamine B) 0.4% (w/v) σε 1% οξικό οξύ σε όλα τα wells με κύτταρα και στα Tzero. Το SRB βάφει τις πρωτεΐνες των κυττάρων. Αφήνουμε τα plate με τη χρωστική για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια απορρίπτουμε τη χρωστική και ξεπλένουμε τα plate με οξικό οξύ 1% για την απομάκρυνση της μη δεσμευμένης χρωστικής.

Τα plates στεγνώνουν στον αέρα.

Ακολουθώς γίνεται προσθήκη 150μl Trizma Base 10mM με αποτέλεσμα την έξοδο της χρωστικής από τα κύτταρα και τη σύνδεσή της με το Trizma Base. Τα κύτταρα επώάζονται για 10 λεπτά στους 37°C. Μετά την 10λεπτη επώαση, τα κύτταρα αναδεύονται σε μπαλαρίνα για 5 λεπτά και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 540nm.

Όσο περισσότερη χρωστική δεσμευτεί με το Trizma Base, τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η απορρόφηση στα 540nm. Αν σε ένα well όπου έχει προστεθεί κάποιος αναστολέας έχουμε κυτταρικό θάνατο, τότε η απορρόφηση θα είναι

μικρότερη σε σχέση με τα control, όπου δεν έχει γίνει προσθήκη κάποιου αναστολέα και τα κύτταρα αναπτύσσονταν κανονικά.

Οι τιμές των απορροφήσεων των wells με αναστολείς, των control και των Tzero αναλύονται στο excel. Πιο αναλυτικά:

- i. Ορίζουμε ως Tc την 100% ανάπτυξη των κυττάρων χωρίς αναστολέα (control) και ως Tz την 0% ανάπτυξη των κυττάρων πριν γίνει η προσθήκη των αναστολέων (Tzero).
- ii. Το ποσοστό ανάπτυξης για κάθε συγκέντρωση αναστολέα (Ti) υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\frac{(Ti - Tz)}{(Tc - Tz)} * 100$$

Για συγκεντρώσεις όπου $Ti \geq Tz$

Όταν $Ti < Tz$, τότε ισχύει:

$$\frac{Tz - Ti}{Tz} * 100$$

Ανάλογα με την τιμή που θα προκύψει, πληροφορούμαστε αν υπήρξε αναστολή ή όχι της ανάπτυξης των κυττάρων και κυτταρικός θάνατος. Στον πίνακα 3 αναγράφονται κάποια ενδεικτικά αποτελέσματα.

Αποτέλεσμα	Ερμηνεία αποτελέσματος
100	Μηδενική αναστολή ανάπτυξης
50	50% αναστολή ανάπτυξης
0	Μηδενική καθαρή αύξηση
-50	50% θνησιμότητα
-100	Όλα τα κύτταρα είναι νεκρά

Πίνακας 3: Απεικόνιση πιθανών αποτελεσμάτων από υπολογισμό της % ανάπτυξης των κυττάρων με αναστολείς και ερμηνεία αυτών.

- iii. Υπολογίζονται και τρεις βασικές παράμετροι απόκρισης για κάθε δόση αναστολέα. Αυτές είναι οι εξής:
 - GI50 (Growth Inhibition of 50%): δείχνει τη δόση του αναστολέα που μειώνει κατά 50% την αύξηση της καθαρής πρωτεΐνης, σε σύγκριση με τα control. $[(Ti - Tz) / (Tc - Tz)] * 100 = 50$.

- TGI (Total Growth Inhibition): δείχνει τη συγκέντρωση του αναστολέα που αναστέλει εξ'ολοκλήρου την ανάπτυξη των κυττάρων, $T_i = T_z$.
- LC50 (Lethal Concentration of 50%): δείχνει τη συγκέντρωση του αναστολέα που μειώνει κατά 50% την πρωτεΐνη, σε σύγκριση με την πρωτεΐνη πριν την χορήγηση του αναστολέα, $[(T_i - T_z)/T_z] \times 100 = -50$.

2.7 Προετοιμασία Λυμάτων από Κύτταρα

Τα βήματα αυτής της διαδικασίας είναι ίδια με τα εννιά πρώτα βήματα της διαδικασίας ψύξης των κυττάρων. Από εκεί κι έπειτα:

- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο από το falcon όπου υπάρχει το pellet των κυττάρων και προσθέτουμε NaCl 0,9% (φυσιολογικός ορός) για να ξεπλύνουμε τα υπολείμματα του θρεπτικού υλικού.
- Στη συνέχεια, ξαναφυγοκεντρούμε στις 1.200 στροφές για 5 λεπτά.
- Στην εστία νηματικής ροής απορρίπτουμε το υπερκείμενο υγρό.
- Τοποθετούμε το falcon με τα κύτταρα έξω από την εστία νηματικής ροής, προκειμένου να στεγνώσει.
- Αποθηκεύουμε στους -80°C .

Επόμενο στάδιο αποτελεί η λύση των κυττάρων και η απομόνωση των πρωτεϊνών τους. Για να γίνει αυτό, πρέπει να παρασκευαστεί αρχικά το Cell Lysis Buffer. Τα υλικά αυτού είναι:

- Ripa 10x, βασικό συστατικό για τη λύση των κυττάρων
- Phosphatase and Protease Inhibitor Cocktail 100x, βοηθά στην αναστολή της δράσης φωσφατασών που μπορεί να δράσουν στο κυτταρικό λύμα και να αποφωσφορυλιώσουν πρωτεΐνες που είναι πιθανοί στόχοι μελέτης και στην αναστολή της δράσης πρωτεασών που μπορεί να καταστρέψουν τις πρωτεΐνες που θα απελευθερωθούν με τη λύση.

Η αγορά τους έγινε από τη Cell Signaling Technology. κωδικοί??

Όλα τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε ddH₂O προκειμένου να παρασκευαστεί διάλυμα 1X για όλους τους παράγοντες. Για να μην αλλοιωθούν τα κύτταρα, είτε βρίσκονται σε μορφή ιζήματος είτε διαλυμένα στο Cell Lysis Buffer, παραμένουν μέσα σε πάγο. Για τη λύση 1×10^6 κυττάρων χρησιμοποιούνται 60μl Cell Lysis Buffer. Επομένως, ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που έχουμε σε ίζημα, θα χρησιμοποιήσουμε και την απαραίτητη ποσότητα Cell Lysis Buffer. Αφού προσθέσουμε Cell Lysis Buffer στα κύτταρα, μεταφέρουμε το υλικό σε Eppendorf 1,5ml. Τα Eppendorf είναι πάντα τοποθετημένα μέσα σε πάγο. Για να δράσει το Cell Lysis Buffer χρειάζονται τουλάχιστον 30 λεπτά. Κάθε 5 λεπτά κατά τη διάρκεια αυτού του μισώρου,

κάνουμε vortex στα Eppendorfs για 10 δευτερόλεπτα το καθένα προκειμένου να αναμειχθούν όλα τα υλικά.

Μόλις ολοκληρωθεί το μισάωρο, τα eppendorfs φυγοκεντρούνται στις 13.000 στροφές για 10 λεπτά, στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο κάθε eppendorf μεταφέρεται σε καινούργιο eppendorf και η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου έχουμε διαυγές υπερκείμενο. Το eppendorf που θα περιέχει το διαυγές υπερκείμενο, θα περιέχει και τις πρωτεΐνες των κυττάρων που λύθηκαν.

2.8 Ανάλυση Bradford

Η ανάλυση Bradford χρησιμοποιείται για να διευκρινιστεί η συγκέντρωση πρωτεΐνης κάθε δείγματος. Για να επιτευχθεί αυτό, είναι απαραίτητη η δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη δημιουργείται με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Για αυτή την διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Το Kit περιέχει τα εξής προϊόντα:

- BCA αντιδραστήριο A, 2 x 500 ml
- BCA αντιδραστήριο B, 25 ml
- Αμπούλες Αλβουμίνης συγκέντρωσης 2mg/ml

Προκειμένου να κατασκευάσουμε την πρότυπη καμπύλη, είναι απαραίτητη η δημιουργία διαδοχικών αραιώσεων της αλβουμίνης. Η αραιώση γίνεται σε RIPA 1x και PBS 1x (1/5 RIPA 1x και 4/5 PBS 1x). Οι συνθήκες αραιώσης της αλβουμίνης πρέπει να είναι ίδιες με αυτές των δειγμάτων. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 2mg/ml, 1.5mg/ml, 1mg/ml, 0.75mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml.

Σε ένα 96 well-ELISA plate προσθέτουμε σε 7 wells 25μl από τις παραπάνω αραιώσεις.

Το δείγμα που μελετάται είναι πιθανό να περιέχει μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης από τα 2mg/ml που έχει η αλβουμίνη. Γι'αυτό, γίνεται αραιώση του δείγματος στο 1/5 της αρχικής ποσότητας και προστίθενται 5μl του δείγματος και 20μl PBS σε νέο well του 96 well plate.

Στη συνέχεια, προσθέτουμε ένα μείγμα των αντιδραστηρίων A και B (Working reagent) που περιέχονται στο kit. Το kit που χρησιμοποιείται είναι της Thermo Scientific, LOT: # QB215363, Prod: #23227, Pierce BCA Protein Assay kit.

Η αναλογία των δύο αντιδραστηρίων είναι: $\frac{A}{B} = \frac{50}{1}$

Σε κάθε well του plate που περιέχει αλβουμίνη ή δείγμα προσθέτουμε 200μl του Working reagent.

Το plate έπειτα τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο για 30 λεπτά, στους 37°C.

Στη συνέχεια, παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και τέλος γίνεται φωτομέτρηση για διεξαγωγή αποτελεσμάτων. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων επιτελείται σε λογισμικό Microsoft Excel. Γίνεται κατασκευή πρότυπης καμπύλης με τα δεδομένα των διαδοχικών αραιώσεων της αλβουμίνης. Με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης και τις τιμές απορροφήσεων των δειγμάτων, γίνεται υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών κάθε δείγματος. Κάθε αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται με το 5 καθώς έχει προηγηθεί αραιώση 1/5 των δειγμάτων. Η παραπάνω διαδικασία είναι άκρως σημαντική, καθώς είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τη συγκέντρωση πρωτεϊνών σε ένα δείγμα έτσι ώστε να χρησιμοποιήσουμε την κατάλληλη ποσότητα δείγματος για την ηλεκτροφόρηση.

2.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών-SDS PAGE

Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μορίων DNA, RNA και πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος τους. Στη συγκεκριμένη πτυχιακή πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών. Η πηκτή που χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση ήταν Bis-Ακρυλαμίδα 30%. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με βάση το μέγεθός τους, δηλαδή με βάση την ικανότητα τους να διαπερνούν τους πόρους της πηκτής. Είχαν όλες αρνητικό φορτίο καθώς χρησιμοποιήθηκε SDS (Sodium dodecyl sulfate, Sigma-Aldrich, Lot #SLBL3120V), ένα απορρυπαντικό που προσδίδει σε όλες τις πρωτεΐνες αρνητικό φορτίο και συμβάλλει στο διαχωρισμό τους βάση του μοριακού τους βάρους, και κατά το φόρτωμα κάθε δείγματος στο τζελ της ηλεκτροφόρησης και μέσα στο Running Buffer 1X, διάλυμα που χρησιμοποιείται για να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση.

Η πυκνότητα της πηκτής επιλέχθηκε ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν. Για τη φάση διαχωρισμού των πρωτεϊνών (resolving) η πυκνότητα της πηκτής ήταν 8%, ενώ για τη φάση στοίχισης των πρωτεϊνών (stacking) ήταν 5%.

Πριν την προσθήκη των δειγμάτων στα πηγαδάκια του stacking είναι απαραίτητη η προσθήκη σε αυτά του loading buffer. Το Loading Buffer χρειάζεται προκειμένου να βρίσκονται οι πρωτεΐνες στην πρωτοταγή τους δομή, για να παρατηρούμε την πορεία της ηλεκτροφόρησης και να την σταματήσουμε την κατάλληλη στιγμή.

Όλα τα δείγματα που θα ηλεκτροφορηθούν πρέπει να είναι σε ίδιο όγκο, με ίδια περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Με την Bradford μπορούμε να προσδιορίσουμε τον όγκο δείγματος που απαιτείται για να έχουμε και την επιθυμητή ποσότητα πρωτεΐνης. Στη συγκεκριμένη διπλωματική άσκηση, για κάθε δείγμα επιθυμούσαμε 35μg πρωτεΐνης. Έτσι, ανάλογα με τις απορροφήσεις των

δειγμάτων από την Bradford, μεταφέραμε την κατάλληλη ποσότητα κάθε δείγματος σε καινούργιο Eppendorf. Εκεί, προσθέταμε PBS 1X για να έχουν όλα τα δείγματα ίδιο τελικό όγκο. Ο τελικός όγκος που επιλέχθηκε για κάθε δείγμα ήταν τα 20μl. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη του Loading Buffer. Επειδή όμως το Loading Buffer που παρασκευάζαμε ήταν 4X, έπρεπε να πάρουμε κατάλληλη ποσότητα προκειμένου να γίνει 1X. Τα τελικά δείγματα με αυτόν τον τρόπο έχουν τον ίδιο όγκο και την ίδια περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Μόλις προσθέταμε Loading Buffer, τοποθετούσαμε τα δείγματα σε βραστό νερό για 5 λεπτά. Αμέσως μετά, μεταφέραμε τα δείγματα σε πάγο προκειμένου να υγροποιηθούν οι υδρατμοί. Τα τζελ ακρυλαμίδης τοποθετούνταν σε κατάλληλη συσκευή της Bio-Rad με Running buffer 1X. Ακολουθώς, σε κάθε πηγαδάκι του τζελ φορτώναμε 25μl των τελικών δειγμάτων. Απαραίτητη είναι και η χρήση ενός μάρτυρα μοριακού βάρους στις άκρες του τζελ. Γι' αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους Thermo 26619. Μόλις έχουν φορτωθεί και τα δείγματα, συνδέεται η συσκευή της ηλεκτροφόρησης με ειδικό μηχάνημα παροχής ηλεκτρικού ρεύματος. Η τάση προσαρμόζεται στα 100V για περίπου 10 λεπτά, χρόνος που χρειάζεται για την στοίχιση των πρωτεϊνών, και στη συνέχεια αυξάνεται στα 200V για περίπου 40 λεπτά. Μετά το πέρασμα αυτού του χρόνου, παρατηρείται να χάνεται το μέτωπο που σχηματίζεται λόγω του Loading Buffer και σταματά η ηλεκτροφόρηση.

2.10 Western Blot

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί το Western blot. Τα βήματα αυτής της διαδικασίας είναι τα εξής:

1. Αρχή της διαδικασίας αποτελεί η ενεργοποίηση των μεμβρανών (Immobilon-P^{SQ} Transfer Membrane, Type: PVDF, LOT:42892-3) με μεθανόλη για 20-30 λεπτά.
2. Έπειτα, γίνεται προετοιμασία της κασέτας-sandwich του Western blot. Στην μαύρη επιφάνεια της κασέτας τοποθετείται ένα βρεγμένο με Transfer buffer 1X σφουγγάρι Whitman.
3. Πάνω στο σφουγγάρι τοποθετείται το τζελ της ηλεκτροφόρησης μαζί με ένα στεγνό χαρτί Whitman που χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά του τζελ από το τζάμι της ηλεκτροφόρησης.
4. Πάνω στο τζελ τοποθετείται η ενεργοποιημένη μεμβράνη, αφού έχει εξισορροπηθεί πρώτα για 5 λεπτά σε διάλυμα Transfer buffer 1X.
5. Απομακρύνονται οι φουσκάλες πάνω από τη μεμβράνη.
6. Τοποθετούμε ένα βρεγμένο με Transfer buffer 1X χαρτί Whitman πάνω στην μεμβράνη και απομακρύνουμε τις φουσκάλες.

7. Τέλος, γίνεται προσθήκη ενός βρεγμένου σφουγγαριού με Transfer buffer 1X πάνω από το τελευταίο χαρτί Whitman και απομακρύνονται οι φουσκάλες.

Η κασέτα κλείνει και τοποθετείται μέσα στην ειδική συσκευή για Western blot. Απαραίτητη είναι η χρήση μιας παγοκύστης και ενός μαγνήτη στον πάτο της συσκευής για μείωση των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται κατά την διαδικασία του Western blot.

Η συσκευή συνδέεται σε μηχανήμα παροχής ηλεκτρικού ρεύματος και παρατηρούνται τα mAmp από τα οποία ξεκινά η διαδικασία. Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το τζελ στην μεμβράνη γίνεται overnight, στους 4°C, καθώς οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν έχουν πολύ υψηλό μοριακό βάρος και χρειάζεται περισσότερος χρόνος για τη μεταφορά τους από το τζελ στη μεμβράνη.

Την επόμενη μέρα, κόβεται η μεμβράνη σε επιθυμητά σημεία προκειμένου να μελετηθούν οι διάφορες πρωτεΐνες-στόχοι. Η πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ισοφορτώματος είναι η ακτίνη, μια πρωτεΐνη που συναντάται σε όλα τα κύτταρα, καθώς συμβάλλει στην διατήρηση του κυτταροσκελετού και σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Πριν την χρήση του πρώτου αντισώματος, το οποίο είναι ειδικό κάθε φορά για κάθε πρωτεΐνη-στόχο, γίνεται «μπλοκάρισμα» της μεμβράνης με TTBS 5% σε FBS. Με αυτόν τον τρόπο, ελαχιστοποιούνται οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του πρώτου αντισώματος.

Η διαδικασία του «μπλοκαρίσματος» απαιτεί μία ώρα.

Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση με το πρώτο αντίσωμα (μονοκλωνικό αντίσωμα), εξειδικευμένο κάθε φορά για την κάθε πρωτεΐνη-στόχο. Κάποιες πρωτεΐνες, όπως οι ακτίνη, η p90 και p-p90, χρειάστηκαν πρώτο αντίσωμα κατασκευασμένο σε ποντικό. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, χρειάστηκαν πρώτο αντίσωμα από κουνέλι.

Η επώαση με το πρώτο αντίσωμα επιτελείται overnight, υπό ανάδευση, στους 4°C.

Την επόμενη μέρα, αφού έχει ολοκληρωθεί η επώαση με το πρώτο αντίσωμα, γίνονται 3 πλύσεις των μεμβρανών με TTBS 1X. Πιο αναλυτικά, αφού απομακρυνθεί το διάλυμα με το πρώτο αντίσωμα από κάθε μεμβράνη, προσθέτουμε περίπου 4-5ml TTBS 1X σε κάθε μεμβράνη για 5 λεπτά, υπό ανάδευση. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Με αυτό τον τρόπο, απομακρύνεται η περίσσεια πρώτου αντισώματος που δεν έχει προσδεθεί στις πρωτεΐνες-στόχους της μεμβράνης.

Μόλις ολοκληρωθούν και οι πλύσεις των μεμβρανών, γίνεται προσθήκη του δεύτερου αντισώματος. Το δεύτερο αντίσωμα διαλυτοποιείται σε διάλυμα TTBS 5% σε FBS, με αναλογία 1:6.000, δηλαδή γίνεται προσθήκη 1μl δεύτερου

αντισώματος σε 6ml TTBS 5% σε FBS. Το δεύτερο αντίσωμα ήταν σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP).

Η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα διαρκεί μία ώρα και επιτελείται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά το πέρας της επώασης αυτής, επαναλαμβάνεται η διαδικασία των τριών πλύσεων με TTBS 1X, για την απομάκρυνση μη συνδεδεμένου δεύτερου αντισώματος.

Η εμφάνιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Imager-UVITEC CAMBRIDGE και χημειοφωταύγειας. Γι'αυτό, απαραίτητη ήταν η χρήση ECL (enhanced chemiluminescence).

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΑΣΗ
1L TTBS 5% σε FBS	<ul style="list-style-type: none">95ml TTBS5ml FBS (BIOSERA) αποστειρωμένο, προσθήκη στην εστία νηματικής ροής
1L TTBS 1X	<ul style="list-style-type: none">1L TBS1ml Tween 20 (Πολυσορβικό 20, απορρυπαντικό και γαλακτωματοποιητής, LOT: 126796, Fisher scientific)
1L TBS	<ul style="list-style-type: none">950ml NaCl 0.9% w/v50ml Tris Cl 1M
1L Tris Cl 1M, pH 7,4	<ul style="list-style-type: none">121gr Tris Base (ChemCruz-Santa Cruz Biotechnology Inc, LOT: A0818)800ml dH₂O Προσαρμογή του pH στο 7,4 με προσθήκη HCl 12N. Αν χρειάζεται, συμπληρώνεται dH ₂ O μέχρι Vτελ= 1L.
1L Tris Cl 1,5M, pH 8,8	<ul style="list-style-type: none">181,5gr Tris Base (ChemCruz-Santa Cruz Biotechnology Inc, LOT: A0818)800ml dH₂O Προσαρμογή του pH στο 8,8 με προσθήκη HCl 12N. Αν χρειάζεται, συμπληρώνεται dH ₂ O μέχρι Vτελ= 1L.
1L Tris Cl 0,5M, pH 6,8	<ul style="list-style-type: none">60,5gr Tris Base (ChemCruz-Santa Cruz Biotechnology Inc, LOT: A0818)800ml dH₂O Προσαρμογή του pH στο 6,8 με προσθήκη HCl 12N. Αν χρειάζεται, συμπληρώνεται dH ₂ O μέχρι Vτελ= 1L.
1L Transfer Buffer 1X	<ul style="list-style-type: none">200ml Μεθανόλη (honeywell riedel-de haën, LOT: I1480)

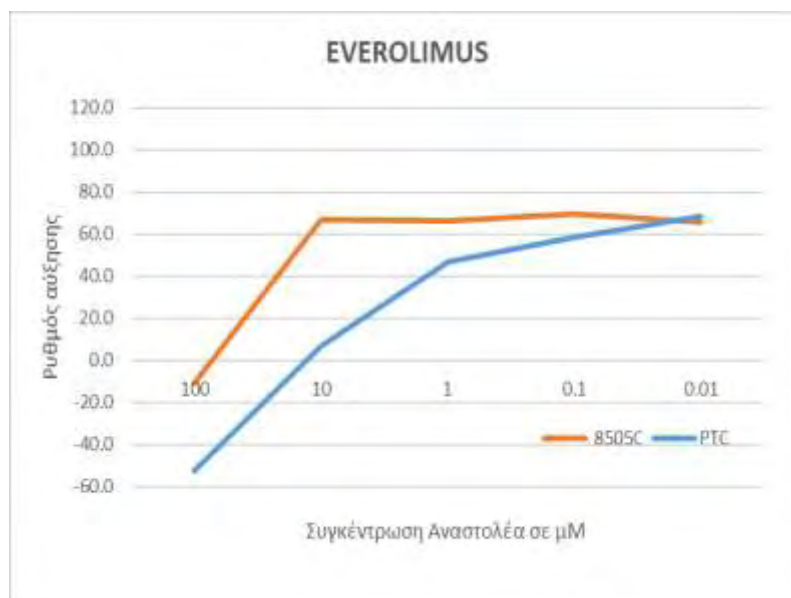
	<ul style="list-style-type: none"> • 700ml dH₂O • 100ml Transfer Buffer 10X
1L Transfer Buffer 10X	<ul style="list-style-type: none"> • 144gr Γλυκίνη (ChemCruz-Santa Cruz Biotechnology Inc, LOT: I2118) • 30,3gr Trizma Base pH 10 • dH₂O μέχρι τελικό όγκο 1L
ECL	<ul style="list-style-type: none"> • Substrate A, peroxide solution, Bio-Rad • Substrate B, Luminol/enhancer solution, Bio-Rad <p>Ανάμειξη των δύο υποστρωμάτων γίνεται σε αναλογία 1:1</p>
1L Running Buffer 10X	<ul style="list-style-type: none"> • 144g Γλυκίνη (ChemCruz-Santa Cruz Biotechnology Inc, LOT: I2118) • 10g SDS • 800ml ddH₂O • Tris Base 30,3g (ChemCruz-Santa Cruz Biotechnology Inc, LOT: A0818) <p>Μόλις διαλυθούν όλα τα συστατικά, γίνεται ρύθμιση του pH στο 8,3 με τη χρήση HCl και συμπληρώνουμε με ddH₂O, αν χρειάζεται, μέχρι το 1L.</p>
1L Running Buffer 1X	<ul style="list-style-type: none"> • Για την παρασκευή Running Buffer 1X, γίνεται αραίωση 100ml Running Buffer 10X με 900ml ddH₂O.
Bis-Ακρυλαμίδα 30%	<ul style="list-style-type: none"> • 29,2g Ακρυλαμίδα (Serva, 10675.02, LOT:140950) • 0,8g N,N'-Methylenebisacrylamide • 60ml ddH₂O, προσθήκη υπό ανάδευση και συνεχίζω να συμπληρώνω με ddH₂O μέχρι τα 100ml.
800μl Loading Buffer	<ul style="list-style-type: none"> • 20% SDS 100μl • 100μl Β-μερκαπτοαιθανόλη, η οποία διασπά δισουλφιδικούς δεσμούς και ξεδιπλώνει όλες τις πρωτεΐνες στην πρωτοταγή τους δομή. • 400μl Γλυκερόλη (ROTH, Art.-Nr.3783.1) • 100μl μπλε της βρωμοφαινόλης, το οποίο βοηθά στην παρατήρηση του «μετώπου» των πρωτεϊνών στην ηλεκτροφόρηση (SIGMA, B0126-25G). • 100μl Tris-HCl 0,5M

Πίνακας 3: Πίνακας όπου αναφέρονται όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεκπαιρέωση αυτής της διπλωματικής εργασίας και η σύστασή τους.

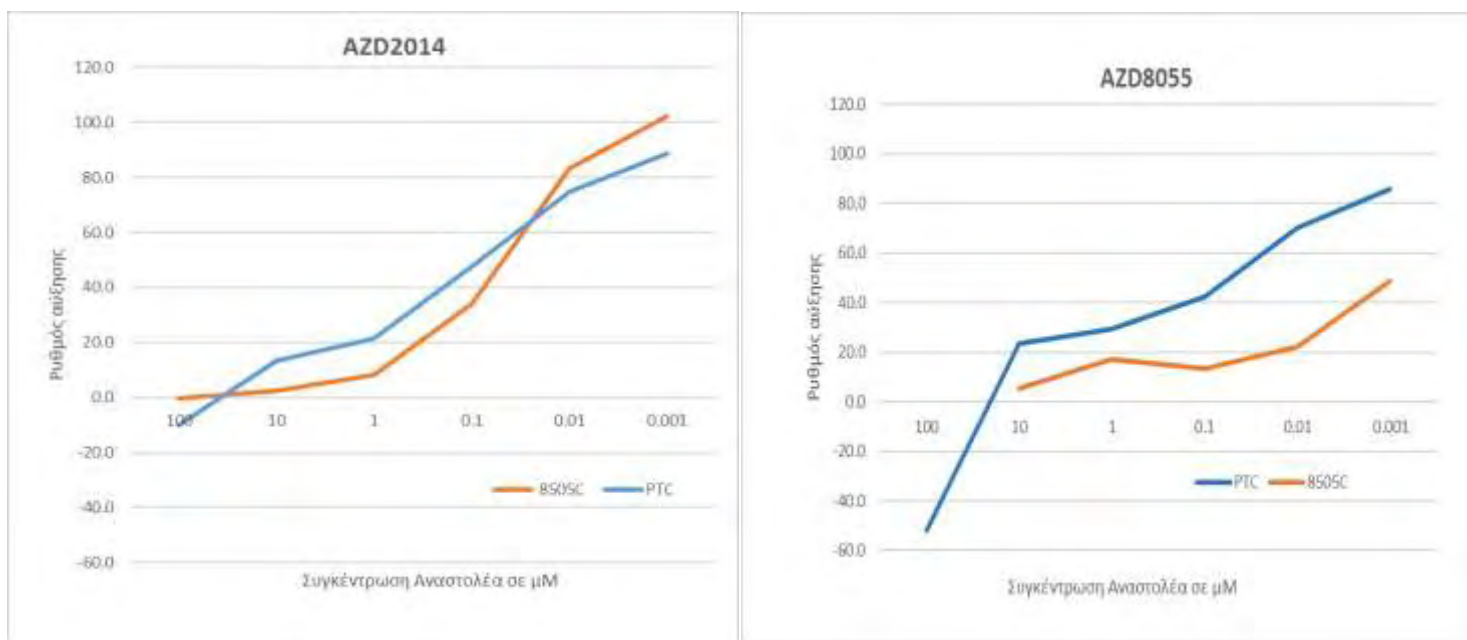
3. Αποτελέσματα

3.1 SRB Assay

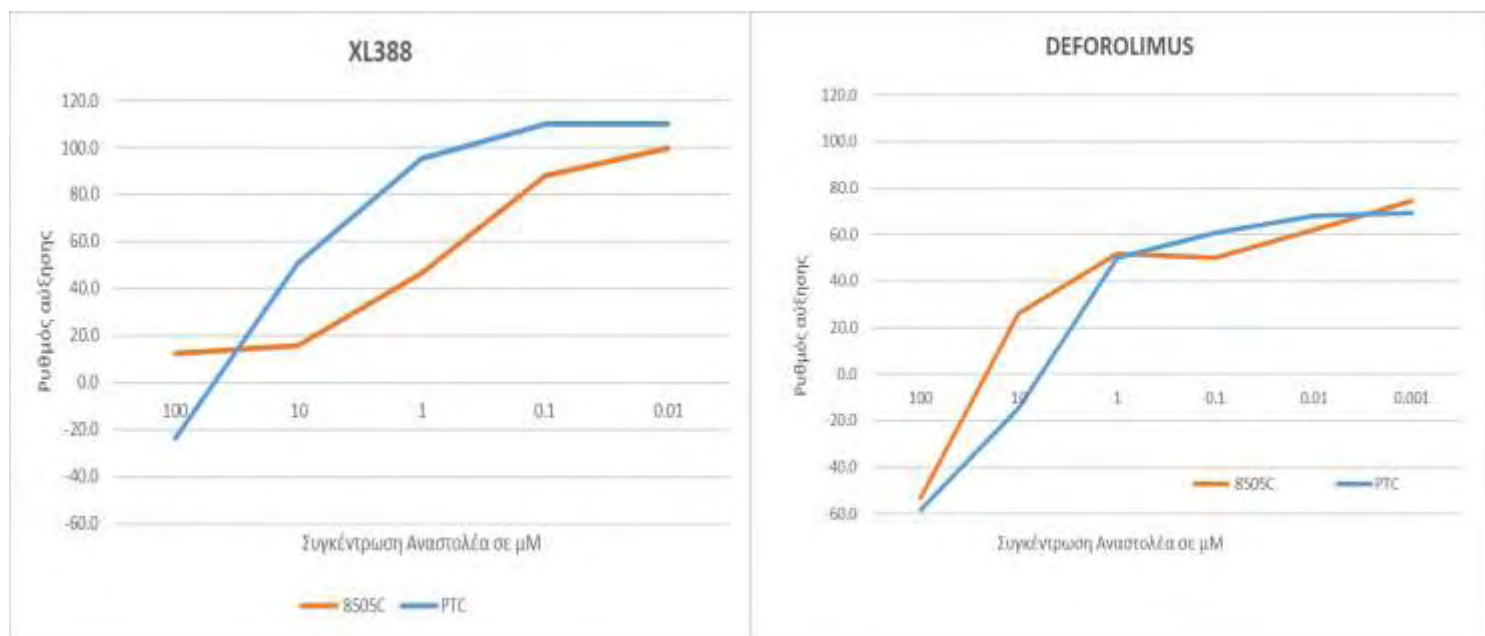
Όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SRB προκειμένου να μελετηθεί η δράση πέντε ουσιών, οι οποίες επιδρούν στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR και πιο συγκεκριμένα, στοχεύουν υπομονάδες της mTOR κινάσης ή δρουν ως ATP ανταγωνιστές αυτής της κινάσης. Ακολουθούν γραφικές παραστάσεις που συγκρίνουν τον ρυθμό αύξησης των δύο κυτταρικών σειρών και πως αυτός επηρεάζεται από την δράση κάθε αναστολέα.



Εικόνα 9: Καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων 8505C και PTC έπειτα από επώαση με τον αναστολέα του mTORC1 Everolimus.

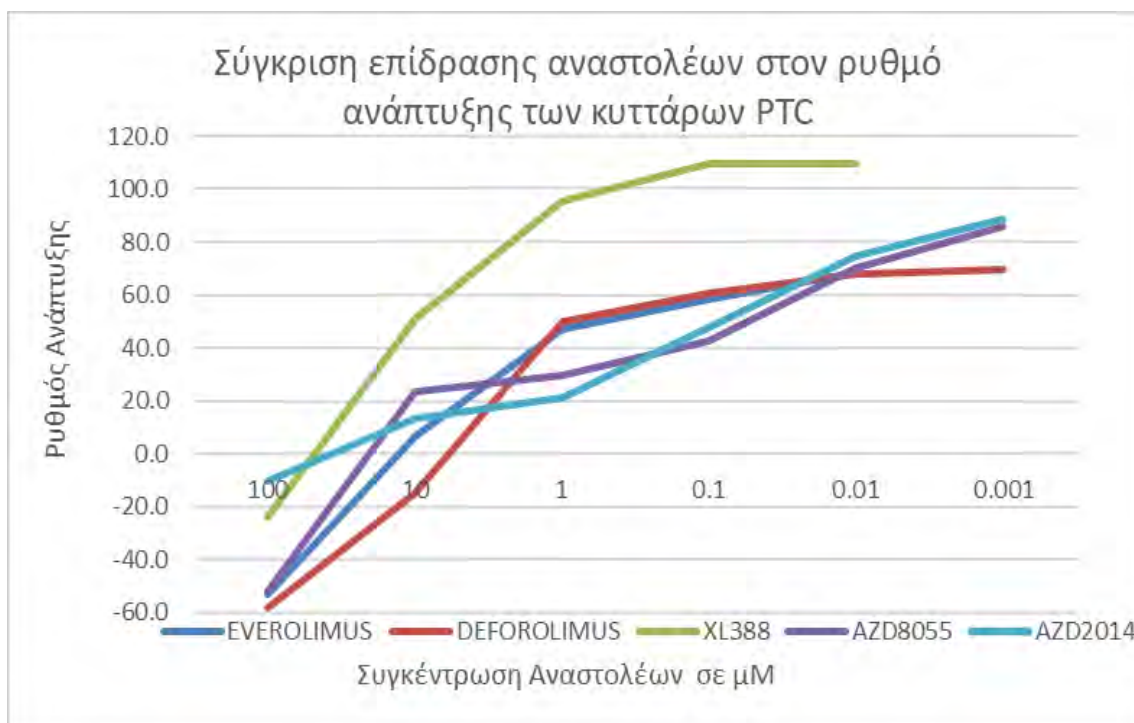
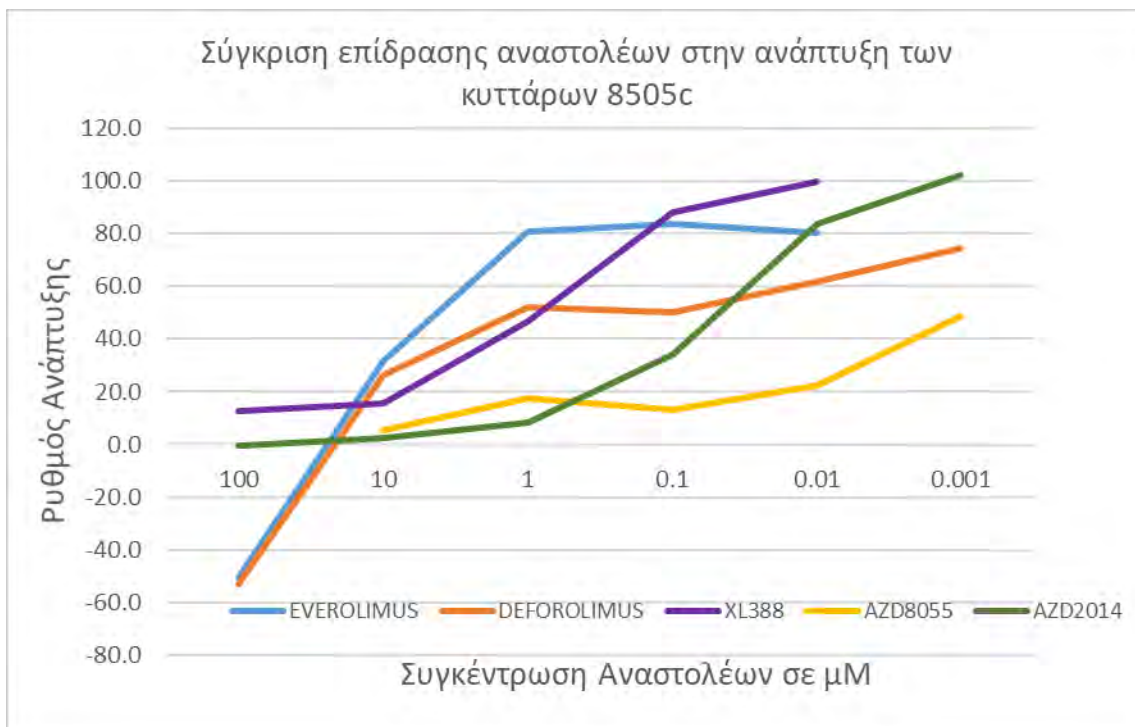


Εικόνα 10: Καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων 8505C και PTC έπειτα από επώαση με τους ATP ανταγωνιστές AZD2014 και AZD8055.



Εικόνα 11: Καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων 8505C και PTC έπειτα από επώαση με τους αναστολείς των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 XL388 και Deforolimus.

Ακολουθούν συγκεντρωτικά διαγράμματα, όπου παρουσιάζεται η επίδραση όλων των αναστολέων στην ανάπτυξη των κυττάρων 8505C και PTC.



Όπως αναλύθηκε προηγουμένως, υπολογίστηκαν τρεις σημαντικές παράμετροι που αφορούν στη δράση των αναστολέων. Αυτές οι παράμετροι είναι:

1. GI50: συγκέντρωση αναστολέα που οδηγεί σε 50% μείωση τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων.
2. TGI: συγκέντρωση αναστολέα που οδηγεί σε αναστολή ανάπτυξης όλων των κυττάρων.
3. LC50: συγκέντρωση αναστολέα που οδηγεί το 50% των κυττάρων σε θάνατο.

	Everolimus	Deforolimus	XL388	AZD2014	AZD8055
GI50	6.6μM	1.6μM	0.04μM	0.1μM	0.001μM
TGI	44.6μM	39.7μM	>100μM	87.2μM	14.0μM
LC50	99.3μM	96.4μM	>100μM	>100μM	51.6μM

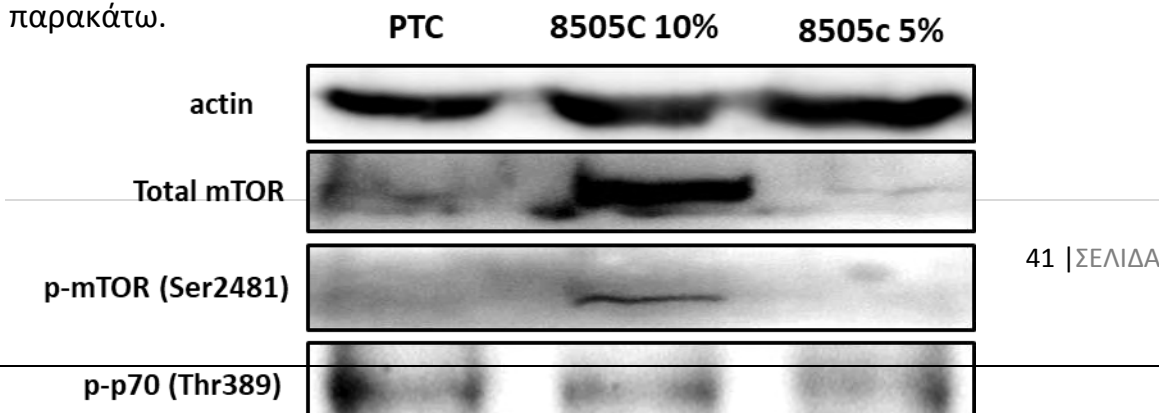
Πίνακας 4: Πίνακας όπου αναγράφονται οι παράμετροι GI50, TGI και LC50 των αναστολέων για τα 8505c κύτταρα.

	Everolimus	Deforolimus	XL388	AD2014	AZD8055
GI50	0.3μM	1.0μM	11.3μM	0.1μM	0.1μM
TGI	20.2μM	7.9μM	71.2μM	61.0μM	37.8μM
LC50	95.5μM	82.6μM	>100μM	>100μM	97.5μM

Πίνακας 5: Πίνακας όπου αναγράφονται οι παράμετροι GI50, TGI και LC50 των αναστολέων για τα PTC κύτταρα.

3.2 Western Blot ανάλυση

Εκτός από την τεχνική του SRB, πραγματοποιήθηκε western blot για τις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC, προκειμένου να συγκριθεί η πρωτεϊνική σύστασή τους. Τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας παρουσιάζονται παρακάτω.

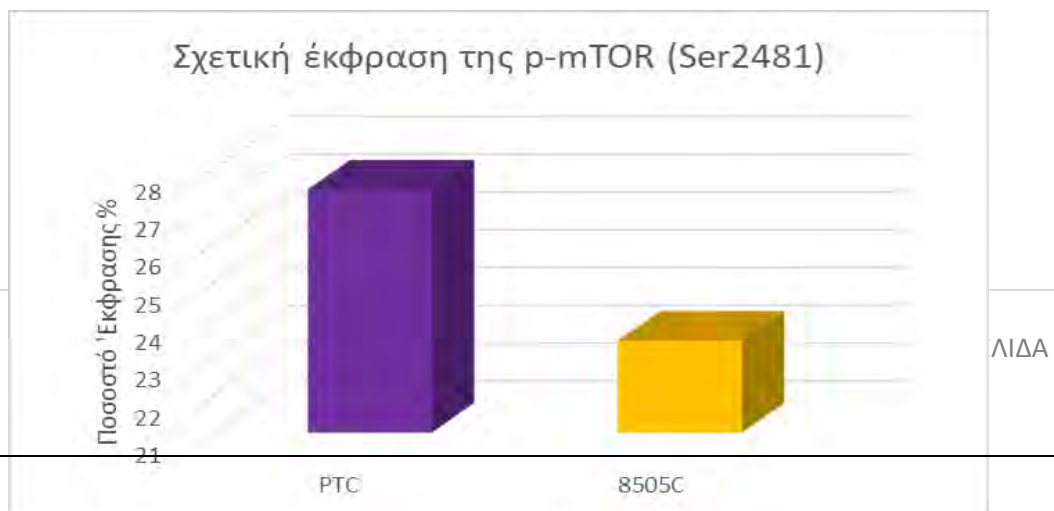


Εικόνα 12: Αποτελέσματα western blot για τις πρωτεΐνες p-mTOR, total mTOR, p-p70, p70, actin και Gβλ. Για τον έλεγχο του ισοφορτώματος κατά την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη. Τα κύτταρα 8505C σε RPMI 10% χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό control.

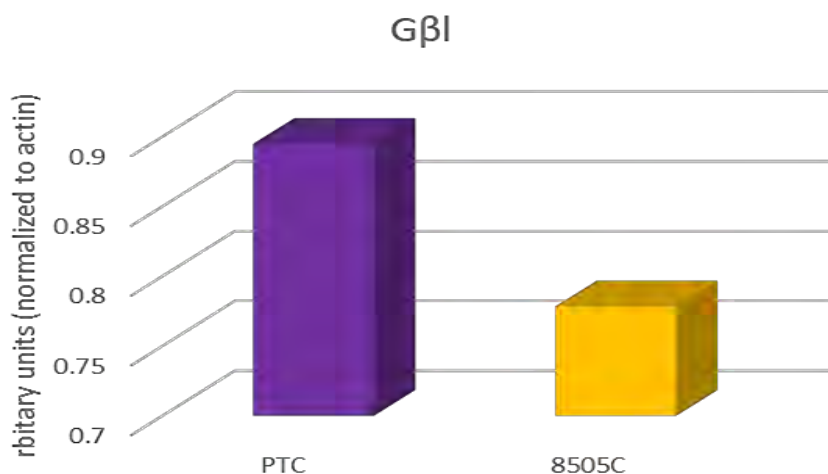
Ακολούθησε η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων προκειμένου να συγκριθούν διαγραμματικά οι σχετικές εκφράσεις των πρωτεϊνών που μελετήθη



Εικόνα 13: Σχετική έκφραση της p-p70(Thr389) στις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC.



Εικόνα 14: Σχετική έκφραση της p-mTOR (Ser2481) στις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC.



Εικόνα 15: Σχετική έκφραση της p-mTOR (Ser2481) στις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC.

4. Συμπεράσματα-Συζήτηση των Αποτελεσμάτων

Με βάση τις παραμέτρους που παρουσιάζονται στους πίνακες 4 και 5, οι δύο κυτταρικές σειρές φαίνεται να έχουν διαφορετική ευαισθησία στους αναστολείς που μελετήθηκαν, ανάλογα με τον βασικό μηχανισμό δράσης του αναστολέα. Εξαιρέση αποτελεί ο AZD2014 όπου οι δύο σειρές εμφανίζουν ίδια ευαισθησία. Γενικά οι αναστολείς δε φαίνεται να είναι κυτταροτοξικοί αλλά περισσότερο ανασταλτικοί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όπως αυτό αντικατοπτρίζεται στις παραμέτρους LC50 και GI50 αντίστοιχα. Ο πλέον κυτταροτοξικός φαίνεται να είναι ο αναστολέας AZD8055, ειδικά στα κύτταρα 8505C.

Η κυτταρική σειρά PTC φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητη στην αναστολή του πολλαπλασιασμού στα Everolimus και Deforolimus όπως φαίνεται από τις παραμέτρους TGI και GI50. Αντίθετα, η κυτταρική σειρά 8505C φαίνεται αρκετά πιο ευαίσθητη στους αναστολείς πρόσδεσης του ATP στην mTOR (με εξαίρεση τον AZD2014 όπως ήδη αναφέρθηκε). Συνολικά, η πιο δραστική ουσία φαίνεται να είναι ο AZD8055 με το χαμηλότερο GI50 έναντι και των δύο κυτταρικών σειρών. Το γεγονός ότι ο συγκεκριμένος αναστολέας εξακολουθεί να έχει υψηλό LC50 υποδεικνύει ότι έχει τον καλύτερο θεραπευτικό δείκτη (Therapeutic Index,

TI=LC50/GI50). Ως εκ τούτου, τουλάχιστον υπό τις πειραματικές συνθήκες που ελεγχθηκε, φαίνεται να είναι ο πιο αξιόλογος αναστολέας για περαιτέρω μελέτη. Η ανάλυση βασικών τελεστών του σηματοδοτικού μονοπατιού mTOR έδειξε ότι το μονοπάτι είναι υπερενεργοποιημένο στην πρωτογενή κυτταρική σειρά PTC σε σχέση με την κυτταρική σειρά 8505C. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει πιθανά έναν πολύ πιο σημαντικό ρόλο του μονοπατιού αυτού στην επιβίωση της κυτταρικής σειράς PTC και πιθανά κατ'επέκταση στο θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς. Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι η κυτταρική αυτή σειρά είναι πιο ευαίσθητη στην αναστολή από τις ουσίες που στοχεύουν την αλληλεπίδραση της κινάσης mTOR με την ανοσοφιλίνη FKBP12 και ιδιαίτερα στο Everolimus το οποίο εμφανίζει πιο ειδική δράση στην αναστολή του συμπλόκου mTORC1. Αυτό πιθανά να αποτελεί ένδειξη ιδιαίτερης σημασίας του συμπλόκου αυτού για την συγκεκριμένη κυτταρική σειρά και ίσως τον τύπο καρκίνου. Συνοψίζοντας, λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα συμπεράσματα της πτυχιακής, θα μπορούσαμε να υποστηρίξουμε πως οι αναστολείς AZD8055 και AZD2014 φαίνεται να είναι οι πιο δραστικοί αναστολείς και στις δύο κυτταρικές σειρές. Ακολουθεί το Deforolimus, το οποίο επιδρά και στα δύο σύμπλοκα της mTOR. Γενικά από την συγκεκριμένη μελέτη προκύπτει ότι η πιο αποτελεσματική μέθοδος είναι αναστολή της πρόσδεσης του ATP στην κινάση. Θα μπορούσαμε λοιπόν να πούμε ότι οι αναστολείς αυτοί είναι πιθανό να αποτελέσουν νέες, πιο αποτελεσματικές, μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον καρκίνο του θυρεοειδούς. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες ειδικά σε ζωικά πρότυπα αντίστοιχων μορφών καρκίνου, κάποιες από τις οποίες είναι ήδη σε εξέλιξη στο εργαστήριό μας.

Βιβλιογραφία

[1]Lauralee Sherwood, «Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου, από τα κύτταρα στα συστήματα», 8^η έκδοση,Brooks/cole Cengage Learning, ελληνική έκδοση: Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε, Αλεξανδρούπολη 2016

[2] http://www.thyroiduk.org.uk/tuk/about_the_thyroid/thyroid_overview.html

[3] Αιμιλία Ζίφα, «Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος», δεύτερη έκδοση, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος 2017.

[4]<https://www.cancer.org/cancer/thyroid-cancer/about/new-research.html>

[5] <https://www.cancer.org/cancer/thyroid-cancer/treating/chemotherapy.html>

- [6] <https://www.nhs.uk/conditions/thyroid-cancer/>
- [7] <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [8] <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer?redirect=true>
- [9] <https://www.nhs.uk/conditions/cancer/symptoms/>
- [10] https://www.phculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=94090184&collection=ecacc_gc
- [11] https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1054
- [12] Bhagwat SV et.al, «Preclinical characterization of OSI-027, a potent and selective inhibitor of mTORC1 and mTORC2: distinct from rapamycin.», 2011, AACR journals, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-1099
- [13] <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3jbz>
- [14] Qing Wang, «Cancer predisposition genes: molecular mechanisms and clinical impact on personalized cancer care: examples of Lynch and HBOC syndromes», 2015, NPG, doi: 10.1038/aps.2015.89
- [15] <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/li-fraumeni-syndrome>
- [16] <http://www.venizeleio.gr/radienergo-iodio-h-thesi-toy-sti-sygchroni-iatriki/>
- [17] Liu P et.al, «Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer», 2009, NCBI, doi:10.1038/nrd2926
- [18] Craig S. Takeuchi et.al, «Discovery of a Novel Class of Highly Potent, Selective, ATP-Competitive, and Orally Bioavailable Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)», 2013, Journal of Medicinal Chemistry
- [19] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01590>

- [20] Harris EJ et.al, «Everolimus in Anaplastic Thyroid Cancer: A Case Series», 2019, Frontiers in Oncology, doi: 10.3389/fonc.2019.00106
- [21] Monica Mita et.al, «Deforolimus (AP23573) a novel mTOR inhibitor in clinical development», 2008, Expert opinion
- [22] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06233>
- [23] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB015904>
- [24] <https://drugs.ncats.io/substance/l36BZ5F3D1>
- [25] Guichard SM et.al, «AZD2014, an Inhibitor of mTORC1 and mTORC2, Is Highly Effective in ER+ Breast Cancer When Administered Using Intermittent or Continuous Schedules», 2015, AACR Journals, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0365.
- [26] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11925>
- [27] Wei Gao et.al, «mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer», 2012, ISRN Otolaryngol, doi: 10.5402/2012/953089
- [28] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB12774>
- [29] <https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/68052-14.aspx>
- [30] Esteban A. Orellana and Andrea L. Kasinski, «Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation», 2016, HHS Public Access, doi: 10.21769/BioProtoc.1984
- [31] <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BVC4>
- [32] <https://www.axonmedchem.com/products/enzymes/transferases/kinases-serine-threonine-specific-protein/p90-rsk>

[33] Rana Anjum & John Blenis, «The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling», Nature Reviews Molecular Cell Biology volume 9, pages 747–758 (2008).

[34] <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=1593&showAllSites=true>

[35] Magnuson B1, Ekim B, Fingar DC. «Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks», Biochemical Journal, 2012, doi: 10.1042/BJ20110892

[36] Moraitis D. et.al, «SIN1, a critical component of the mTOR-Rictor complex, is overexpressed and associated with AKT activation in medullary and aggressive papillary thyroid carcinomas», 2014, Elsevier, doi: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.08.095>

[37] <https://www.rndsystems.com/resources/articles/novel-pathway-tor-independent-autophagy-regulation-akt>

[38] <https://www.addexbio.com/productdetail?pid=19>

[39] Anjum, R., & Blenis, J, «The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling», 2008, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9(10), 747–758. doi:10.1038/nrm2509

[40] Kannan Murugan A., et. Al «Identification and characterization of two novel oncogenic mTOR mutations», 2019, Oncogene volume 38, pages 5211–5226

[41] Elaine Cristina Lima de Souza et.al, «The mTOR protein as a target in thyroid cancer», 2011, Taylor & Francis online, <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.594044>

[42] <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PIK3CA>

[43] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5979>